

Resum

En les últimes dècades, l'estudi en el desenvolupament de sutures absorbibles ha portat a la creació de fils de sutura amb característiques diverses i focalitzades a usos concrets. La incorporació de compostos actius en sutures proporciona noves propietats al fil, les quals poden minimitzar riscos postoperatoris.

En el present Projecte Fi de Carrera, s'ha treballat amb una sutura quirúrgica monofilar bioabsorbible, comercialitzada amb el nom de Monosyn[®], formada per un copolímer segmentat constituït per un segment rígid de poliglicolida i un segment flexible derivat de tres components: glicolida, carbonat de trimetilè i ϵ -caprolactona. S'ha estudiat el comportament de la sutura al incorporar-li clorhexidina (CHX), un antimicrobià d'ample espectre, i captopril, un inhibidor de l'enzim convertidor d'angiotensina que afavoreix la vasodilatació en els teixits perifèrics, donant una major irrigació i fent que una ferida es pugui cicatritzar més ràpidament. La càrrega d'ambdós fàrmacs s'ha realitzat en assajos independents, en banys de diferent concentració de fàrmac, i mitjançant dos mètodes: adsorció per immersió sobre el fil de sutura, i adsorció amb posterior immersió en un bany de recobriment: LA-co-TMC 35:65 3%.

La síntesi del copolímer de recobriment segueix un procés de polimerització en massa per obertura d'anell. Després d'analitzar tèrmica (DSC) i estructuralment (FT-IR, RMN) el copolímer, s'ha optimitzat la metodologia emprada per a recobrir els fils de sutura, tenint en compte variables com el temps d'immersió i la concentració del bany de recobriment. La selecció de la metodologia òptima s'ha basat en la morfologia del copolímer dipositat sobre la superfície de la sutura, observada mitjançant SEM.

L'alliberació dels fàrmacs en medis de diferent hidrofilitat/hidrofobicitat, etanol absolut i una mescla de tampó fosfat salí PBS i etanol absolut 30:70 v/v, s'ha quantificat amb espectroscòpia UV-Vis.

S'han efectuat estudis biològics per tal d'avaluar el poder antibacterià de la clorhexidina, realitzant assajos tant quantitatius d'inhibició i adhesió de dos bacteries, com qualitatiu mitjançant plaques d'agar. La biocompatibilitat de clorhexidina s'ha analitzat avaluant la proliferació i l'adhesió de dos línies cel·lulars. Pel que fa al captopril, s'ha observat la seva biocompatibilitat i s'ha realitzat un estudi del seu caràcter cicatritzant.

Finalment, s'ha elaborat un estudi de sostenibilitat ambiental, social i econòmic.

Sumari

RESUM	1
SUMARI	3
1. GLOSSARI	5
2. PREFACI	9
2.1. Origen del projecte	9
2.2. Motivació	9
2.3. Requeriments previs	9
3. OBJECTIU	11
3.1. Objectius específics.....	11
3.2. Abast del projecte.....	12
4. INTRODUCCIÓ	13
4.1. Polímers biodegradables.....	13
4.1.1. Polièsters alifàtics	14
4.2. Aplicacions biomèdiques.....	20
4.2.1. Administració de proteïnes.....	21
4.2.2. Enginyeria de teixits	21
4.2.3. Administració de gens.....	21
4.3. Sutures quirúrgiques	22
4.3.1. Monosyn®: GL- <i>b</i> -[GL-co-TMC-co-CL]- <i>b</i> -GL	26
4.3.2. Recobriments.....	27
4.3.3. Càrrega de fàrmacs	27
4.4. Antecedents	32
5. MATERIAL I MÈTODES	34
5.1. Polimerització per obertura d'anell	34
5.1.1. Materials	34
5.1.2. Síntesi del copolímer LA-co-TMC	34
5.2. Càrrega de fàrmacs en la sutura Monosyn®	35
5.2.1. Materials	35
5.2.2. Incorporació del fàrmac.....	35
5.3. Caracterització físico-química	35
5.3.1. Cromatografia de permeació en gel (GPC).....	35
5.3.2. Calorimetria Diferencial de Rastreig (DSC).....	36

5.3.3.	Espectroscòpia infraroja (FT-IR)	37
5.3.4.	Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN).....	38
5.4.	Anàlisi Morfològic.....	39
5.4.1.	Microscopi electrònic de rastreig (SEM).....	39
5.5.	Anàlisi de les Cinètiques d'Alliberació.....	40
5.5.1.	Alliberació de fàrmacs.....	40
5.5.2.	Espectroscòpia d'Absorció Ultravioleta-Visible (UV-Vis)	40
5.6.	Anàlisi Biològic.....	41
5.6.1.	Cultius Bacterians	41
5.6.2.	Cultius Cel·lulars	44
6.	RESULTATS EXPERIMENTALS I DISCUSSIÓ	47
6.1.	Copolímer de recobriment	47
6.1.1.	Caracterització físico-química	47
6.1.2.	Optimització del procés de recobriment dels fils de sutura	51
6.2.	Incorporació de CHX en fils de sutura	
	GL- <i>b</i> -[GL-co-TMC-co-CL]- <i>b</i> -GL.....	55
6.2.1.	Determinació de la quantitat total de CHX carregada	57
6.2.2.	Alliberació de CHX.....	58
6.3.	Incorporació de captopril en fils de sutura	
	GL- <i>b</i> -[GL-co-TMC-co-CL]- <i>b</i> -GL.....	62
6.3.1.	Determinació de la quantitat total de captopril carregat	64
6.3.2.	Alliberació de captopril	65
6.4.	Assajos biològics	69
6.4.1.	Activitat antibacteriana dels fils de sutura amb CHX	69
6.4.2.	Adhesió i proliferació cel·lular en fils de sutura amb CHX i captopril	75
6.4.3.	Activitat cicatritzant dels fils de sutura amb captopril.....	81
	CONCLUSIONS	83
7.	ESTUDI DE SOSTENIBILITAT	85
7.1.	Avaluació del impacte ambiental i sobre la salut (EIAS).....	85
7.2.	Avaluació del impacte social.....	88
7.3.	Avaluació econòmica	89
	AGRAÏMENTS	91
	BIBLIOGRAFIA.....	93

1. Glossari

BT	Butilen tereftalat
CF ₃ COONa	Trifluoroacetat de sodi
CHX	Clorhexidina
CL	ϵ -caprolactona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , medi de creixement cel·lular
DMSO	Dimetilsulfòxid
DSC	Calorimetria diferencial de rastreig
EtOH	Etanol
FT-IR	Espectroscòpia d'Infraroig amb Transformada de Fourier
GL	Glicolida
GPC	Cromatografia de permeació en gel
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol
HFP	Hexafluoropropilè
LA	Lactida
Lag	Fase de latència, [h]
LLA	L-lactida
MTT	Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
PA	Poliamida alifàtica
PBAT	Poli(butilen adipat-co-tereftalat)
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> , tampó fosfat salí
PCL	Polic(ϵ -caprolactona)

PDLLA	Poli(DL-lactida)
PDO	Poli(<i>p</i> -dioxanona)
PE	Polietilè
PET	Polietilè tereftalat
PGL	Poliglicolida
PGLA	Poli(lactida-co-glicolida)
PHMB	Polihexametilen biguanida
PLA	Polilactida
PLLA	Poli(L-lactida)
PLGA	Poli(lactida-co-glicolida)
P(LLA-DLLA)	Poli(L-lactida-co-DL-lactida)
P(LLA-GL)	Poli(L-lactida-co-glicolida)
PP	Polipropilè
PPDO	Poli(<i>p</i> -dioxanona)
PTMC	Poli(carbonat de trimetilè)
PTMEG	Politetrametilen èter glicol
P4HB	Poli-4-hidroxibutirat
RMN	Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear
ROP	<i>Ring Opening Polymerization</i> (polimerització per obertura d'anell)
SEM	Microscopi electrònic de rastreig
T _c	Temperatura de cristal·lització
T _g	Temperatura de transició vítria
T _m	Temperatura de fusió

TMC	Carbonat de trimetilè
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV-Vis	Espectroscòpia d'absorció Ultravioleta-Visible
EP	<i>European Pharmacopeia</i>
VDF	Fluorur de vinilidè
wt%	Percentatge en pes
ΔH_c	Entalpia de cristal·lització
ΔH_m	Entalpia de fusió
μ	Velocitat de creixement, [h ⁻¹]

2. Prefaci

2.1. Origen del projecte

Aquest projecte s'origina dins el grup d'investigació Polímers Sintètics, Estructura i Propietats (PSEP), del departament d'Enginyeria Química de la UPC. El grup manté una col·laboració amb l'empresa *B. Braun Surgical S.A.*, fet que ha suscitat treballs relacionats amb els fils de sutura. Fruit d'aquest conveni, s'han desenvolupat projectes i tesis doctorals dirigides en l'àmbit de la biomedicina.

2.2. Motivació

És conegut que les sutures són un dels factors que promouen la infecció de ferides. Els hospitals i professionals quirúrgics porten a terme una sèrie d'estratègies a fi de minimitzar, tant les despeses en combatre contaminacions, com el risc d'infeccions. Per això mateix, els últims avanços referents a material biomèdic estan orientats a desenvolupar productes amb un baix risc d'infecció.

Participar en un projecte d'investigació enfilat a dotar noves propietats als materials de sutura, ha estat l'impuls personal que he necessitat per voler formar-hi part. Tot el procés m'ha permès profunditzar en els coneixements sobre polímers biodegradables i l'ús d'instrumentació. A més, he pogut assimilar nous conceptes relatius al camp de la biomedicina.

2.3. Requeriments previs

Per al correcte desenvolupament d'aquest Projecte Fi de Carrera son necessaris uns coneixements científico-tècnics sobre l'estructura i propietats dels polímers biodegradables.

S'ha realitzat una recerca bibliogràfica per tal de profunditzar en temes com els polièsters alifàtics més emprats en aplicacions biomèdiques, sutures quirúrgiques i els dos fàrmacs a estudiar. També és imprescindible conèixer les tècniques de caracterització de polímers.

3. Objectiu

L'objectiu general d'aquest Projecte Fi de Carrera és el de dotar d'activitat antibacteriana o de cicatrització accelerada als fils de sutura monofilars, de manera que aquestes modificacions superficials dels fils generin un nou producte amb valor afegit. Tanmateix, es vol valorar l'interès que pot suscitar el fet de recobrir els fils de sutura.

3.1. Objectius específics

La primera part d'aquest projecte comprèn la síntesi d'un copolímer constituït de LA i TMC en proporcions en pes 35:65. Els objectius concrets s'enumeren a continuació:

1. Anàlisi microestructural mitjançant FT-IR i RMN.
2. Anàlisi tèrmic i del pes molecular mitjançant DSC i GPC, respectivament.
3. Optimització de les condicions del procediment de recobrir els fils de sutura.

En la segona part, es desenvolupa la incorporació de compostos actius en sutures quirúrgiques bioabsorbibles. Els objectius concrets són:

4. Desenvolupament de sutures monofilament de naturalesa segmentada amb propietats antibacterianes i accelerants de cicatrització. Incorporació de clorhexidina, com agent antimicrobià, i captopril, com a cicatritzant, mitjançant dos mètodes: adsorció del fàrmac i adsorció del fàrmac amb posterior agregació de recobriment.
5. Quantificació dels fàrmacs carregats en els fils de sutura, i determinació de l'alliberació d'aquests en els dos medis i segons els dos mètodes d'incorporació, mitjançant la tècnica espectroscòpia UV-Vis.

Per últim, la tercera part aborda l'estudi biològic avaluant la influència de la concentració del fàrmac i del mètode emprat:

6. Avaluació *in-vitro* de la capacitat antibacteriana dels fils de sutura carregats amb clorhexidina.
7. Avaluació *in-vitro* de la biocompatibilitat dels fils de sutura carregats amb clorhexidina i captopril.
8. Avaluació *in-vitro* del caràcter cicatritzant dels fils de sutura carregats amb captopril.

3.2. Abast del projecte

El projecte inclou la síntesi, caracterització i optimització del procés d'incorporació del copolímer de recobriment en els fils de sutura, així com la càrrega, quantificació i anàlisi de les alliberacions dels compostos farmacològicament actius en els fils de sutura. També comprèn l'anàlisi de la proliferació (quantitativa i qualitativament) i l'adhesió bacteriana en els fils carregats amb clorhexidina, i la viabilitat i adhesió de dues línies cel·lulars en fils de sutura amb propietats tant antibacterianes com cicatritzants. Per últim, es planteja l'estudi del caràcter cicatritzant, mitjançant una línia cel·lular, dels fils de sutura carregats amb captopril.

4. Introducció

4.1. Polímers biodegradables

En les últimes dècades, l'interès pels polímers biodegradables, i més concretament els biopolímers biodegradables, ha augmentat considerablement per diverses raons: problemes d'eliminació de residus, fent que s'acumulin en el medi ambient; increment del preu del petroli; i perquè els polímers posseeixen un gran potencial gràcies a la seva versatilitat, donant lloc a materials amb una extensa varietat de propietats físiques i mecàniques.

Els polímers biodegradables es poden classificar en polímers sintètics o naturals. En la *Figura 4.1.1.* es mostra una classificació dels polímers biodegradables actualment en ús^[1], segons la seva font d'origen.

La bioactivitat inherent dels polímers naturals presenta alguns desavantatges respecte als sintètics: una resposta immune associada a la majoria de polímers, la complexitat associada amb la seva purificació i la possibilitat de transmissió de malalties. Per altra banda, els polímers sintètics són generalment inerts biològicament, presenten propietats més predictibles i tenen l'avantatge de tenir perfils de propietats fets a mida per a aplicacions específiques.

Els materials biodegradables s'utilitzen en un gran ventall d'àrees; una de les quals és la biomedicina, i dins d'aquesta, especialment com a sutures quirúrgiques absorbibles. L'èxit de la primera sutura sintètica basada en la poliglicolida durant la dècada de 1960, va conduir al disseny i desenvolupament d'una nova matriu de polímers biodegradables com implants ortopèdics transitoris i en altres aplicacions relacionades amb la medicina^[2]. Des de llavors, nombroses investigacions han anat dissenyant sistemes personalitzats de polímers biodegradables amb cinètiques predictibles com a mitjans d'administració de fàrmacs, entre altres coses.

La degradació dels polímers biodegradables està fortament influenciada per l'estructura de la seva cadena principal. La presència d'enllaços hidrolítica o enzimàticament sensibles, n'és el requeriment més important. Així doncs, depenent de la forma en què es degraden, els polímers biodegradables es poden classificar en polímers hidrolíticament degradables (via passiva) i polímers enzimàticament degradables (via activa).

La majoria dels polímers d'origen natural es sotmeten a la degradació enzimàtica, com ara els polisacàrids i les proteïnes. Els polímers d'origen natural poden ser considerats com els primers biomaterials biodegradables utilitzats clínicament.

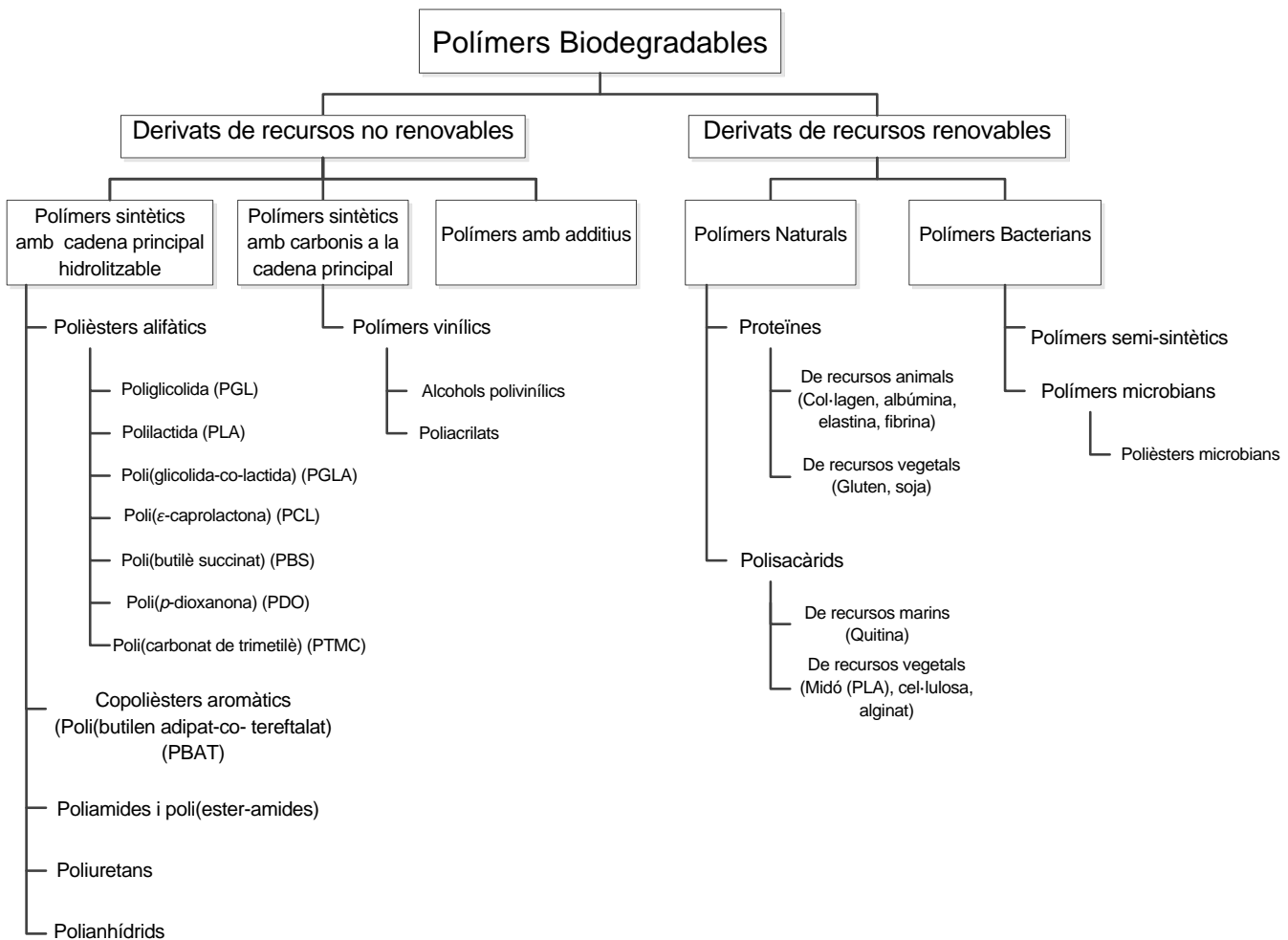


Figura 4.1.1. Classificació dels diferents polímers biodegradables utilitzats actualment.

En canvi, els polímers sintètics acostumen a ser hidrolíticament degradables. Aquests polímers tenen enllaços químics hidrolíticament inestables a la seva cadena principal. Els grups funcionals susceptibles a la hidròlisi inclouen èsters, anhídrids, carbonats, amides, uretans, etc^[3]. Existeixen dues rutes per desenvolupar polímers hidrolíticament sensibles: policondensació i polimerització per obertura d'anell.

4.1.1. Polièsters alifàtics

Els polièsters són els polímers biodegradables més investigats. Són polímers termoplàstics amb enllaços èster alifàtics hidrolíticament inestables en la seva cadena principal. Encara que, teòricament, tots els polièsters són degradables, només els polièsters alifàtics amb cadenes alifàtiques curtes entre els enllaços èster, es poden degradar amb el temps requerit per a la majoria de les aplicacions biomèdiques.

Els factors que afecten en la degradació hidrolítica dels polièsters alifàtics es citen a continuació^[4]:

- Composició química.
- Pes molecular.
- Distribució del pes molecular.
- Distribució d'homopolímers.
- Distribució de les unitats quirals.
- Defectes de cadena.
- Presència de compostos amb baix pes molecular (monòmers, oligòmers, dissolvents, iniciadors, drogues).
- Historial de processat.
- Morfologia (templat, *quenching* –refredament ràpid des de l'estat fos–, microestructures, tensions residuals, porositat).
- Historial d'emmagatzematge.
- Forma i mida.
- Condicions d'envelliment (temperatura, força iònica, intercanvi iònic, pH).
- Absorció i adsorció de compostos (aigua, lípids, ions).
- Canvis en propietats físiques (forma, mida, coeficients de difusió, tensions, esquerdes).
- Presència d'enzims.

La singularitat d'aquests polímers resideix en la seva immensa diversitat i versatilitat sintètica. Dins d'aquests, s'ha indagat molt en els poli(α -hidroxiàcids), que inclouen el poli(àcid glicòlic) i les formes estereoisomèriques del poli(àcid làctic).

Altres polièsters alifàtics s'han desenvolupat com a biomaterials biodegradables per la seva bona biocompatibilitat i perfils controlables de degradació.

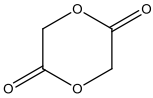
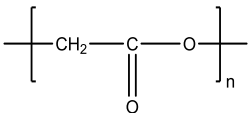
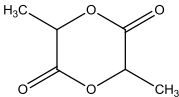
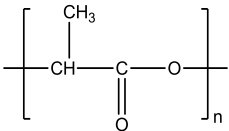
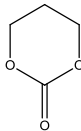
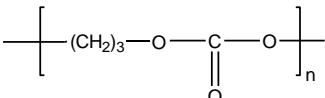
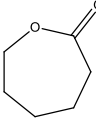
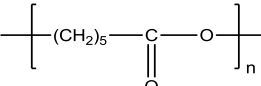
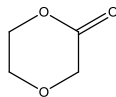
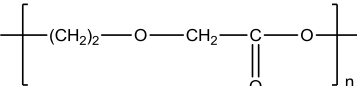
Els polièsters es poden sintetitzar per policondensació de monòmers bifuncionals, com ara l'autocondensació d'hidroxiàcids, diàcids amb diols, entre altres. Mitjançant aquesta síntesi s'obtenen polímers de baix pes molecular, per aquesta raó, no es fa servir per al desenvolupament de biomaterials^[5].

La polimerització per obertura d'anell (ROP: *Ring Opening Polymerization*) de lactones cícliques és la via més efectiva per obtenir polièsters d'elevat pes molecular i baixa polidispersitat. Un dels principals avantatges d'emprar lactones per a la síntesis de polièsters és la possibilitat de purificar-los mitjançant recristal·lització o destil·lació, abans de la polimerització^[6]. Per aquest procediment es tenen alguns avantatges respecte la policondensació: condicions més suaus de reacció, temps de reacció més curts i absència de subproductes^{[2],[7]}.

La polimerització per ROP es pot realitzar en volum, en solució, en una emulsió o en una dispersió. És necessària la presència d'un catalitzador o iniciador eficaç per començar la

polimerització que segueixi la norma general de microreversibilitat^{[7],[8]}. Depenent de l'iniciador, la polimerització procedeix d'acord amb tres mecanismes de reacció diferents: catiònic, aniònic, o de coordinació-inserció. Els iniciadors i catalitzadors més freqüentment utilitzats en ROP de lactones i lactides són l'octanoat d'estany, l'isopropòxid d'alumini i l'isopropòxid de lantànid^[7].

Taula 4.1.1. Estructura de lactones cíclics amb el seu corresponent homopolímer.

Lactona cíclica	Homopolímer lineal
	
Glicolida	Poliglicolida
	
Lactida	Polilactida
	
Carbonat de trimetilè	Poli(carbonat de trimetilè)
	
ϵ -caprolactona	Poli(ϵ -caprolactona)
	
p-dioxanona	Poli(p-dioxanona)

- **ROP catiònica:** Aquest mecanisme (*Figura 4.1.2.*) implica la formació d'una espècie carregada positivament que posteriorment és atacada per un monòmer, donant lloc a l'obertura de l'anell de les espècies carregades positivament. La polimerització catiònica és difícil de controlar i sovint només es formen polímers de baix pes molecular.

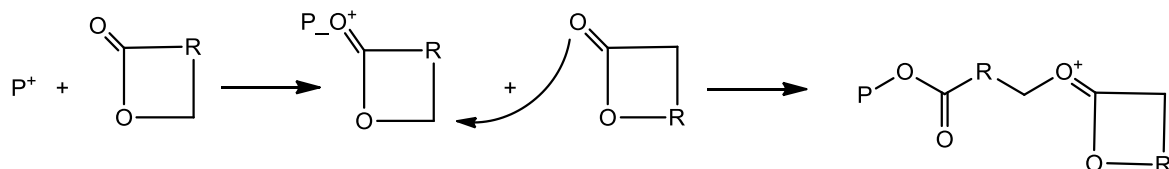


Figura 4.1.2. Polimerització per ROP d'un èster cíclic mitjançant mecanisme catiònic.

- **ROP aniónica:** La polimerització aniónica d'èsters cíclics es duu a terme per l'atac nucleòfil d'un iniciador amb càrrega negativa en el carboni del grup carbonil o en el carboni adjacent a l'oxigen acil, el que resulta un polièster lineal (*Figura 4.1.3.*).

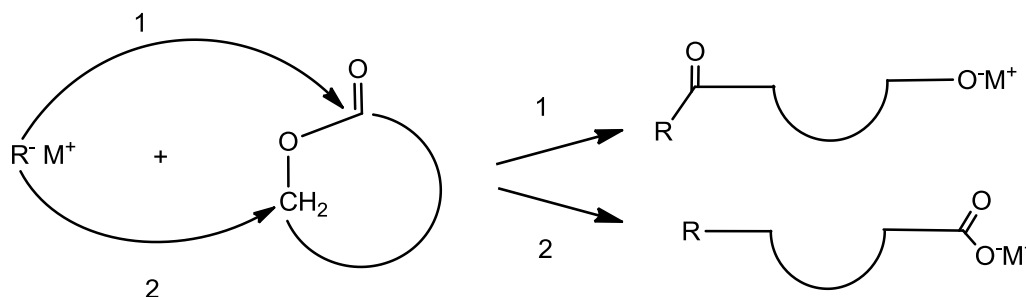


Figura 4.1.3. Polimerització per ROP d'un èster cíclic mitjançant mecanisme aniónic.
Obertura d'anell per 1) ruptura d'enllaç acil-oxigen i 2) ruptura d'enllaç alquil-oxigen.

La polimerització aniónica en dissolvents polars, és un dels millors mètodes de control que porten a la obtenció de polímers d'alt pes molecular.

- **ROP per coordinació-inserció:** La polimerització per obertura d'anell pseudo-aniónica es refereix a la polimerització per obertura d'anell per coordinació-inserció, ja que es creu que la propagació procedeix de la coordinació del monòmer a les espècies actives, seguit de la inserció del monòmer en l'enllaç metall-oxigen pel reendrecament dels electrons. La cadena en creixement roman unida al metall a través d'un enllaç alcòxid durant la propagació (*Figura 4.1.4.*). La reacció finalitza per hidròlisi formant un grup terminal hidroxil.

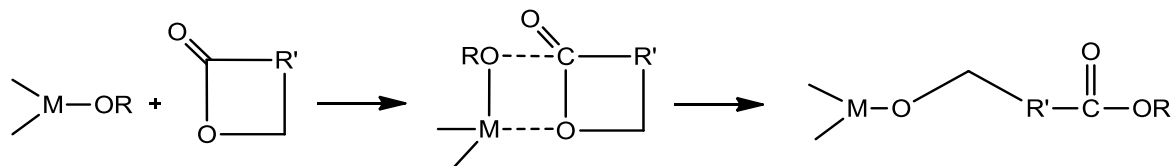


Figura 4.1.4. Polimerització per ROP d'un èster cíclic mitjançant mecanisme de coordinació-inserció.

Existeixen altres mètodes per desenvolupar polièsters, com ara la poliesterificació enzimàtica d'origen bacterià^[15].

Els polímers biodegradables més comuns sintetitzats per a aplicacions mèdiques són la poliglicolida (PGL), polilactida (PLA), poli(*p*-dioxanona) (PDO), poli(carbonat de trimetilè) (PTMC) i poli(ϵ -caprolactona) (PCL)^[10]. A la *Taula 4.1.2.* es mostren les propietats més característiques d'aquests polièsters alifàtics.

Taula 4.1.2. Propietats dels polièsters alifàtics (valors aproximats)^{[1],[2],[7],[11],[12],[13]}.

Polímer	T _g [°C]	T _m [°C]	Cristal·linitat [%]	Mòdul de Young [MPa]	Pèrdua Tensió [mesos]	Pèrdua Massa [mesos]
PGL	35–40	220–225	45–55	7,0·10 ³	1–2	6–12
PLLA	60–65	175	37	2,7·10 ³	–	> 24
PDLLA	55–60	–	–	1,9·10 ³	1–2	12–16
PCL	–60	55–60	50	400	–	–
PTMC	–20	–	–	–	–	–
PDO	–10–0	107–112	55	1,5·10 ³	1–2	6–12

4.1.1.1. Poliglicolida

La poliglicolida és el polièster alifàtic lineal més simple i es pot considerar un dels primers polímers sintètics biodegradables investigats per aplicacions biomèdiques. La PGL va ser utilitzada per desenvolupar la primera sutura sintètica totalment absorbible, Dexon® (any 1969)^{[2],[10],[11]}. El seu mecanisme de degradació, per via metabòlica, és el principal atractiu per aquestes aplicacions. La degradació es duu a terme per erosió homogènia en dues etapes: la primera implica la difusió d'aigua a les regions amorfes de la matriu i l'escissió d'enllaços èster alifàtics; mentre que la segona implica les àrees cristal·lines, que es tornen predominants quan la majoria de les regions amorfes s'han erosionat^[14].

El seu elevat grau de cristal·linitat fa que presenti una baixa solubilitat en dissolvents orgànics.

Les tècniques de processament de PGL més comuns són l'emmotllament per extrusió, injecció i compressió^{[2],[14]}. El mètode més habitual per sintetitzar PGL d'alt pes molecular és mitjançant ROP de glicolida (*Taula 4.1.1.*), el dímer cíclic de l'àcid glicòlic. Els catalitzadors més utilitzats inclouen compostos organometàl·lics d'estany, antimoni o zinc.

4.1.1.2. Polilactida

La polilactida s'obté usualment per policondensació de D- o L-àcid làctic, o per ROP de lactida (*Taula 4.1.1.*), el dímer cíclic de l'àcid làctic. En el segon cas, té millors propietats mecàniques. La PLA és un polímer molt hidrofòbic per la presència de radicals metil.

La lactida pot existir en tres formes diferents: dos estereoisòmers, D-lactida i L-lactida, i en forma racèmica, DL-lactida. L'isòmer L-lactida s'obté de recursos naturals (fermentació de carbohidrats per bacteris làctics^[15]), i la DL-lactida, sintèticament. Per això mateix, s'empra l'isòmer L-lactida en la majoria d'aplicacions, ja que es metabolitza per l'organisme^{[2],[14],[16]}. La PLLA s'utilitza més per aplicacions de suport de càrrega, com ara en la fixació ortopèdica i en sutures; mentre que la PDLLA és més atractiva com a sistema d'administració de fàrmacs i regeneració de teixits^{[2],[10]}.

4.1.1.3. Poli(ϵ -caprolactona)

La poli(ϵ -caprolactona) (PCL) és un polièster que s'obté per ROP de la unitat monomèrica ϵ -caprolactona (*Taula 4.1.1.*). Aquest monòmer cíclic és relativament barat, característica que el fa atractiu^{[1],[2]}. La polimerització es catalitza normalment amb octanoat d'estany o dihidrat de clorur estànnic^{[17],[18]}.

Altres factors, a part de l'econòmic, que creen interès per la PCL són la seva lenta degradabilitat, la alta permeabilitat a molts fàrmacs i la no toxicitat. Totes aquestes característiques originen un polímer adequat per a l'alliberament controlat de fàrmacs a llarg termini^[19]. La seva excel·lent biocompatibilitat fa que sigui un polímer àmpliament emprat en l'enginyeria de teixits^[20].

4.1.1.4. Poli(carbonat de trimetilè)

El poli(carbonat de trimetilè) (PTMC) s'obté mitjançant ROP del carbonat de trimetilè (*Taula 4.1.1.*). Aquest polièster es comporta com un elastòmer mostrant una excel·lent flexibilitat i una resistència mecànica pobre. El fet de presentar propietats mecàniques desfavorables, pot limitar en alguns casos la seva aplicació, i per tant s'ha de modificar^[21]. Les modificacions es poden dur a terme per barreja física i copolimerització. La modificació a través de copolimerització té alguns avantatges, com ara el control de propietats del copolímer, tals com la temperatura de fusió, la temperatura de transició vítria, la cristal·linitat, la duresa i la biodegradabilitat; tot això s'aconsegueix mitjançant la manipulació de la composició del monòmer en l'alimentació^[22].

És un bon candidat com a material d'implant per a la regeneració de teixit tou. En canvi, quan es té PTMC de baix pes molecular, el seu ús és més apropiat com a vehicle d'administració de fàrmacs^{[2],[23]}.

4.1.1.5. Poli(*p*-dioxanona)

La poli(*p*-dioxanona) es prepara habitualment per ROP del monòmer cíclic *p*-dioxanona (*Taula 4.1.1.*). La síntesi es produeix amb el monòmer fos, utilitzant octanoat d'estany ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) com a catalitzador^[24]. Es diferencia estructuralment de la PGL perquè un grup èster es substitueix per un èter. Presenta una alta cristal·linitat i hidrofobicitat, característiques que fan que es consideri un polímer amb una degradabilitat moderadament lenta^[2].

Aquest polièster alifàtic s'ha utilitzat àmpliament com a material de sutura biodegradable, però no només és un bon candidat per a ús mèdic, sinó també per a propòsits més genèrics com a films, productes modelats, laminats, adhesius i recobriments^[25].

4.2. Aplicacions biomèdiques

Les aplicacions mèdiques dels polímers biodegradables constitueixen un dels camps de major interès en el desenvolupament de macromolècules, pel seu ús com a dispositius terapèutics cardiovasculars, ortopèdics, oftalmològics i dentals, substitutius de la pell, sistemes d'alliberació de fàrmacs i sensors amb propòsit diagnòstic^[6].

Els polímers emprats per a tals aplicacions, requereixen una alta biocompatibilitat, és a dir, la capacitat d'un material per dur a terme una resposta hoste apropiada en una aplicació específica, sense tenir efectes tòxics o perjudicials en el sistema biològic. Tots els polièsters alifàtics descrits anteriorment en són un clar exemple. Aquests, al ser introduïts en el sistema biològic, es consideren biomaterials polimèrics.

Les propietats inherents dels biomaterials que poden afectar a la seva biocompatibilitat inclouen la química del material, el seu pes molecular, els mecanismes de degradació i erosió, el caràcter hidrofílic/hidrofòbic i la forma i estructura de l'implant, entre altres.

Es pot definir un biomaterial com un material destinat a interactuar amb els sistemes biològics per avaluar, tractar, augmentar o reemplaçar qualsevol teixit, òrgan o funció corporal^[26].

Els biomaterials biodegradables han de posseir unes propietats mecàniques apropiades per a cada aplicació; la variació d'aquestes propietats amb la degradació ha de ser compatible amb el procés de curació o regeneració. Destacar també que no han de provocar una resposta inflamatòria sostinguda o tòxica després de la implantació en el cos i han de disposar d'una vida útil adequada^[2].

Sutures absorbibles, cargols d'os, enginyeria de teixits (*scaffolds*) i sistemes d'administració de fàrmacs, són algunes de les aplicacions biomèdiques atribuïdes als biopolímers (*Taula 4.2.1.*).

Taula 4.2.1. Aplicacions de diferents biomaterials^{[2],[10],[19],[23],[27],[28]}.

Biopolímer	Aplicació
PGL	Cirurgia ortopèdica, sutures
PLLA	Cirurgia ortopèdica, oral i maxil·lofacial, sutures
PDLLA	Administració de fàrmacs, regeneració de teixits
P(LLA-DLLA)	Cirurgia ortopèdica, oral i maxil·lofacial
P(LLA-GL)	Sutura quirúrgica periodontal
PCL	Administració de fàrmacs a llarg termini, reconstrucció de teixits, sutures
PTMC	Regeneració de teixit tou, administració de fàrmacs, sutures

4.2.1. Administració de proteïnes

La forma tradicional d'administrar fàrmacs proteics requereix múltiples injeccions per aconseguir efectivitat terapèutica. Per aquesta raó, s'han desenvolupat alternatives de dosificació sostinguda^[29]. Polièsters alifàtics com ara PLLA, PDLLA i PLGA s'han estudiat àmpliament per a l'alliberament controlat de proteïnes i pèptids. El principal motiu pel qual s'empren polímers biodegradables, és que l'alliberament del fàrmac proteic carregat depèn principalment de la cinètica de degradació del polímer; i aquesta alliberació es pot ajustar modificant ratis entre homopolímers i el pes molecular.

No obstant això, a causa d'alguns inconvenients associats amb interaccions desfavorables proteïna-polímer, acidificació de la matriu durant la degradació, acilació de les proteïnes encapsulades i dificultat d'adaptació de l'alliberació^[30], fan qüestionar si els sistemes són aplicables pel desenvolupament de formulacions amb bons rendiments.

4.2.2. Enginyeria de teixits

Els polímers biodegradables més utilitzats per aplicacions d'enginyeria de teixits són la PCL, el PLA i la PLGA. Els inconvenients d'aquests polièsters alifàtics són la seva baixa hidrofilitat i la manca de grups funcionals, el que restringeix l'adhesió cel·lular, factor important per construir andamis temporals (*scaffolds*)^{[28],[31]}. Un altre inconvenient és la seva lenta degradació hidrolítica^[30].

El principal objectiu de l'enginyeria de teixits és desenvolupar substituents biològics per restaurar, substituir o regenerar teixits defectuosos. Els *scaffolds* configuren el suport estructural per a l'adhesió cel·lular i el posterior desenvolupament tissular^[32].

4.2.3. Administració de gens

Recentment, la teràpia gènica ha esdevingut important per al tractament de malalties genètiques; els sistemes de subministrament de gens virals com ara l'adenovirus i el retrovirus, han manifestat eficàcies elevades de transfecció. Tot i això, la seva aplicació es veu limitada pels efectes secundaris que poden causar: immunogenicitat i mutagènesi originada pels virus de les cèl·lules infectades^[30].

4.3. Sutures quirúrgiques

La funció de les tècniques de tancament de ferides és mantenir unides les vores del teixit fins que la curació es completa. Segons la ferida, la sutura ha de tenir unes propietats i característiques concretes. Un cop curada la ferida, les sutures són relativament poc importants, però si la sutura és absorbible, aquesta ha de persistir íntegrament fins que la força a la tracció de la ferida hagi arribat al nivell adequat. En algunes situacions és necessari que la sutura tingui una vida prolongada, és a dir, que no sigui absorbible; per exemple en cirurgia vascular^[33]. A part de les sutures, també existeixen altres mètodes per tancar ferides, com ara les grapes, cintes i adhesius.

Les sutures quirúrgiques absorbibles són una de les aplicacions biomèdiques més destacades dels biopolímers. Es consideren sutures absorbibles a aquelles que perden la major part de la seva resistència a la tensió en 2 mesos. L'absorció es pot donar lloc mitjançant un procés de degradació enzimàtic o hidrolític. Normalment es prefereixen les sutures sintètiques, ja que al ser hidrolíticament absorbibles, presenten un mecanisme d'absorció més estable i previsible^[34].

En general, les sutures es poden classificar segons l'origen de la matèria primera (naturals o sintètiques), segons l'estructura del fil (monofilars o multifilars (trenada o retorçada)) i segons el seu caràcter absorbible o no.

Les característiques que hauria de posseir un sutura ideal es citen a continuació ^{[34],[35],[36]}:

- | | |
|---|--|
| - Facilitat de maneig | - Capil·laritat nul·la |
| - Nuament segur | - Antial·lèrgica |
| - Resistència a la tracció i rendiment previsible | - No sigui cancerígena |
| - Esterilitat | - No promogui la reacció del teixit o infecció |
| - No redueixi la mida dels teixits | - Baix cost |
| - Facilitat per retirar-la (no absorbibles) | |

Les propietats més importants dels materials de sutura (*Figura 4.3.1.*) són les físiques i mecàniques, les de manipulació, les biològiques i de biodegradació.

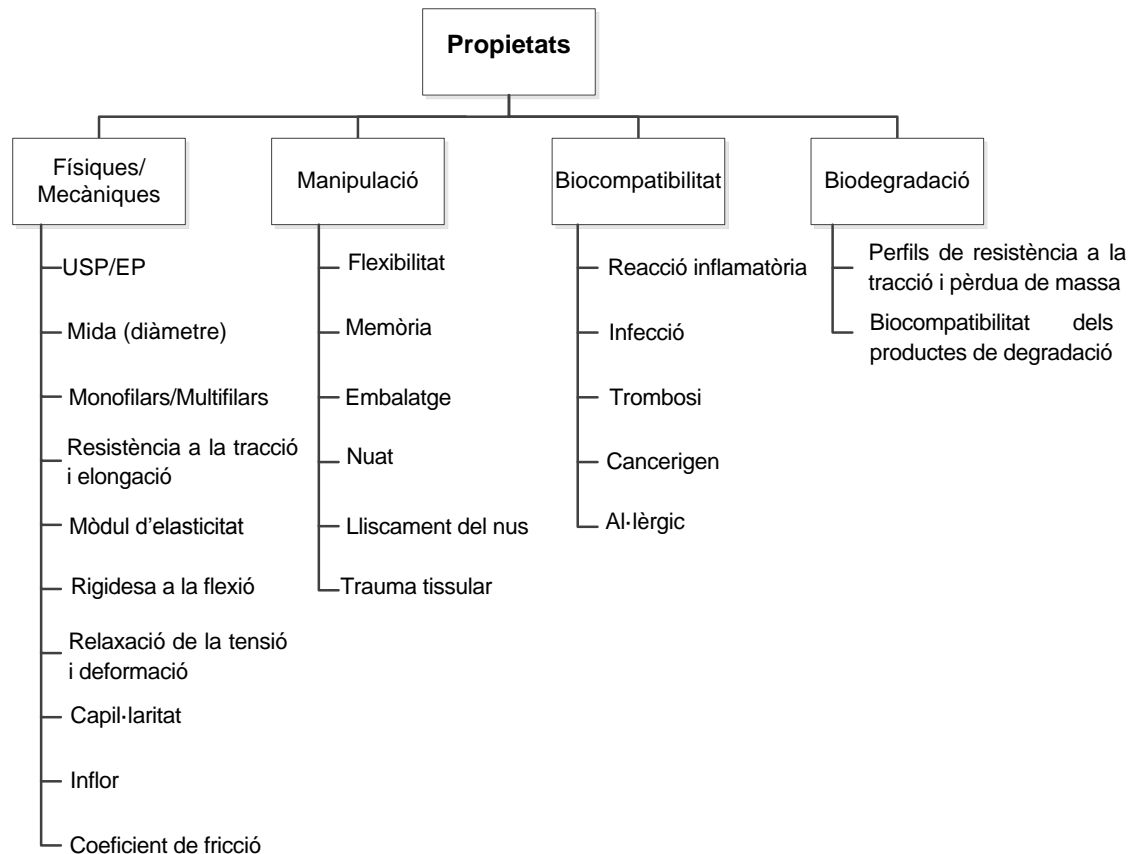


Figura 4.3.1. Propietats dels materials de sutura^[37].

La superfície d'una sutura monofilament és molt suau i llisca fàcilment a través dels teixits, però també és difícil de manipular i lligar. Aquest tipus de sutura es caracteritza per la seva poca flexibilitat. Contràriament, les sutures multifilament no llisquen còmodament a través dels teixits, provoquen arrossegament tissular i major ferida; en canvi, són molt flexibles, manipulables i segures en el nuat. Aquestes últimes, tenen una gran superfície, amb una matriu arquitectònica tridimensional, molt més complexa que no pas les monofilament^[38].

Les sutures monofilament presenten una capil·laritat nul·la, propietat que les fa summent interessants en el desenvolupament de nous estudis. La capil·laritat d'una sutura descriu la facilitat amb què els fluids poden migrar al llarg del fil de sutura, cosa que juga un paper important en la propagació d'infeccions. Aquesta propietat avantatjosa, juntament amb les descrites anteriorment i la creació de sutures monofilars segmentades –les quals milloren la flexibilitat i el maneig–, ha donat lloc a sutures monofilars amb els beneficis d'ambos tipus (monofilar i multifilar), fet que els professionals de tots els àmbits atorguen el futur de les sutures a les sutures monofilament.

A continuació, en les Taules 4.3.1. i 4.3.2. es mostren les principals sutures quirúrgiques disponibles en el mercat.

Taula 4.3.1. Sutures quirúrgiques disponibles comercialment^{[39],[40],[41]}.

Sutures Absorbibles				
Origen	Nom	Configuració	Característiques	Fabricant
Naturals	Softcat [®] chrom	Monofilament	Col·lagen	B. Braun Surgical
	Softcat [®] plain	Monofilament	Col·lagen	B. Braun Surgical
Sintètiques	Chronic-Gut	Monofilament	Col·lagen	Ethicon, Covidien
	Plain-Gut	Monofilament	Col·lagen	Ethicon, Covidien
	Biosyn [™]	Monofilament	GL/PDO/TMC (60:14:26)	Covidien
	Caprosyn [™]	Monofilament	GL/ CL/TMC/LA	Covidien
	Dexon [™] S	Monofilament/ Multifilament Trenada	PGL	Covidien
	Dexon [™] II	Multifilament Trenada	PGL Recoberta	Covidien
	Maxon [™]	Monofilament	GL/TMC	Covidien
	Monocryl [®]	Monofilament	GL/CL	Ethicon
	Monocryl [®] Plus	Monofilament	GL/CL Carregada amb Triclosan	Ethicon
	MonoPlus [®]	Monofilament	PDO Absorbible a llarg termini	B. Braun Surgical
	MonoMax [®]	Monofilament	P4HB Absorbible a molt llarg termini	B. Braun Surgical
	Monosyn [®]	Monofilament	GL/ CL/TMC (72:14:14) Absorbible a mig termini	B. Braun Surgical
	Monosyn [®] Quick	Monofilament	GL/ CL/TMC (72:14:14) Absorbible a curt termini	B. Braun Surgical
	Novosyn [®]	Multifilament Trenada	P(GL/LLA) (90:10) Absorbible a mig termini- recoberta	B. Braun Surgical
	PDS [®] II	Monofilament	PDO	Ethicon
	PDS [®] Plus	Monofilament	PDO Carregada amb Triclosan	Ethicon
	Polysorb [™]	Multifilament Trenada	P(GL/LLA) (90:10) recoberta	Covidien
	Safil [®]	Multifilament Trenada	PGL Absorbible a mig termini- recoberta	B. Braun Surgical
	Safil [®] Quick	Multifilament Trenada	PGL Absorbible a curt termini- recoberta	B. Braun Surgical
	Vicryl [®]	Multifilament Trenada	P(GL/LLA) (90:10) recoberta	Ethicon
	Vicryl Rapide [™]	Multifilament Trenada	P(GL/LLA) (90:10) recoberta	Ethicon
	Vicryl [®] Plus	Multifilament Trenada	P(GL/LLA) (90:10) Carregada amb Triclosan- recoberta	Ethicon

Taula 4.3.2. Sutures quirúrgiques disponibles comercialment^{[39],[40],[41]}.

Sutures No Absorbibles				
Origen	Nom	Configuració	Característiques	Fabricant
Naturals	Linatrix®	Multifilament Retorçada	Lli recoberta	B. Braun Surgical
	Perma-Hand®	Multifilament Trenada	Seda	Ethicon
Sintètiques	Silkam®	Multifilament Trenada	Seda recoberta	B. Braun Surgical
	Dafilon®	Monofilament	PA 6 i 6,6	B. Braun Surgical
	Dagrofil®	Multifilament Trenada	PET	B. Braun Surgical
	Ethilon®	Monofilament	PA 6 i 6,6	Ethicon
	Ethibond Excel®	Multifilament Trenada	PET recoberta	Ethicon
	Mersilene®	Multifilament Trenada	PET	Ethicon
	Monosof™ ~ Dermalon™	Monofilament	PA 6 i 6,6	Covidien
	Novafil™	Monofilament	P(TMEG/BT)	Covidien
	Nurolon®	Multifilament Trenada	PA 6 Recoberta	Ethicon
	PremiCron®	Multifilament Trenada	PET Recoberta	B. Braun Surgical
	Premilene®	Monofilament	PP	B. Braun Surgical
	Prolene®	Monofilament	PP	Ethicon
	Pronova®	Monofilament	P(HFP/VDF)	Ethicon
	Steelex®	Monofilament Multifilament Retorçada	Acer inoxidable	B. Braun Surgical
	Supramid®	Monofilament Pseudo-monofilament	PA 6 PA 6,6 coberta de PA 6	B. Braun Surgical
	Surgical Stainless Steel	Monofilament	Acer inoxidable 316L	Ethicon Covidien
	Surgidac™	Multifilament Trenada	PET	Covidien
	Surgilon™	Multifilament Trenada	PA 6,6	Covidien
	Surgipro™ II ~ Surgipro™	Monofilament	PP+PE	Covidien
	Ti•Cron™	Multifilament Trenada	PET recoberta/no recoberta	Covidien
	Trelon®	Multifilament Trenada	PA 6,6 recoberta	B. Braun Surgical
	Vascufil™	Monofilament	P(TMEG/BT) recoberta	Covidien

Segons el tipus d'intervenció quirúrgica, són necessàries sutures més o menys gruixudes. A la *Taula 4.3.3.* es tabulen els calibres existents en el mercat amb la nomenclatura oficial (USP), la decimal (EP), la corresponent mida en mm i l'ús que se li fa.

Taula 4.3.3. Calibres de les sutures i els seus usos ^{[36], [42]}.

USP	EP	Límits de diàmetre [mm]	Usos
<8/0	<0,4	-	Oftalmologia, microcirurgia
7/0	0,5	0,050-0,069	Oftalmologia, microcirurgia
6/0	0,7	0,070-0,099	Cara, vasos sanguinis
5/0	1	0,100-0,149	Cara, coll, vasos sanguinis
4/0	1,5	0,150-0,199	Mucosa, coll, mans, cames, tendons, vasos sanguinis
3/0	2/2,5	0,200-0,249	Extremitats, tronc, vísceres, vasos sanguinis
2/0	3	0,300-0,339	Tronc, aponeurosis, vísceres, vasos sanguinis
0	3,5	0,350-0,399	Tancament de la paret abdominal, aponeurosis, àrees de drenatge, línies arterials, cirurgia ortopèdica.
>1	>4	-	Tancament de la paret abdominal, aponeurosis, àrees de drenatge, línies arterials, cirurgia ortopèdica.

4.3.1. Monosyn[®]: GL-*b*-[GL-co-TMC-co-CL]-*b*-GL

Monosyn[®] és una sutura sintètica absorbible monofilar composta per un copolímer segmentat tricomponent de glicolida (72 wt%), carbonat de trimetilè (14 wt%) i ϵ -caprolactona (14 wt%)^[39] (*Figura 4.3.2.*). El bloc central està configurat per un copolímer aleatori de GL-co-TMC-co-CL (35 wt%:32,5 wt%:32,5 wt%). A aquest bloc se li anomena segment flexible “*soft segment*”, el qual dota a la sutura de bones característiques de maneig. Als extrems del bloc central es situa el que es designa com a segment rígid “*hard segment*”, compost per GL, proporciona alta resistència^[43]. La combinació d'ambdós segments donen lloc a unes característiques úniques.

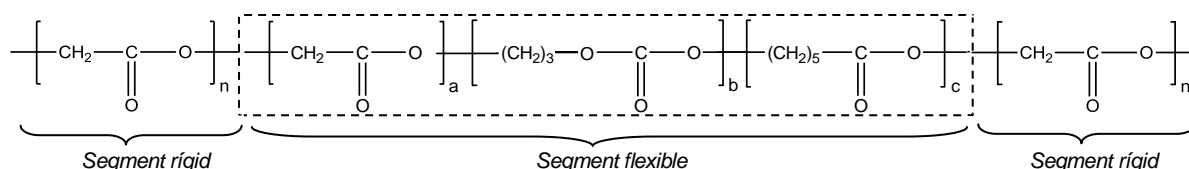


Figura 4.3.2. Estructura de la sutura Monosyn[®].

La intenció d'emprar una estructura química tribloc és fer que les sutures sintètiques absorbibles monofilars tinguin unes propietats de manipulació adequades, sense comprometre altres propietats mecàniques, com ara la resistència i seguretat del nus i les propietats de biodegradació^[37]. Algunes de les seves característiques són:

- Pèrdua del 50% de la resistència inicial als 14 dies (període de residència útil)
- Absència de pèrdua de la resistència inicial (força de tensió) passats els 28 dies.
- Absorció completa per hidròlisi als 60-90 dies.

Monosyn[®] és una sutura idònia pel tancament de plans subcutanis i de la pell, cirurgia de les vísceres, pediàtrica, plàstica i reconstructiva.

4.3.2. Recobriments

Els recobriments es van desenvolupar per modificar la superfície d'agulles i sutures. Amb les agulles l'objectiu és millorar la precisió i la penetració^[44]. La configuració de les sutures multifilament és capaç de provocar trauma tissular per fricció; recobrint-les, es redueix aquest problema de manera significant degut a la homogeneïtzació de la superfície^[45]. A més, el recobriment facilita el desplaçament del nus, millora el lliscament, redueix la irritació i la capil·laritat

Els materials tradicionalment emprats com a recobriments són no absorbibles: silicona, parafina i politetrafluoroetilè entre altres^[37]; no obstant, en els últims anys l'atractiu de sutures absorbibles ha portat a la creació de recobriments també de caràcter absorbible. La tendència a seguir és el desenvolupament de materials de recobriment amb propietats químiques similars a la sutura.

Existeixen dos tipus de recobriments absorbibles: els solubles en aigua i els que no ho són. El fet d'emprar una sutura recoberta, repercuteix directament i negativament en la seguretat del nus. Els recobriments solubles en aigua però, no presenten els mateixos efectes adversos en quant a seguretat del nus; això es deu a la ràpida dissolució que deixa la sutura nua^[37].

4.3.3. Càrrega de fàrmacs

La infecció de ferides és una de les complicacions postoperatòries més comuns. Les variables que poden incrementar el risc de SSI (*Surgical Site Infection*), és a dir, d'infecció en l'àrea quirúrgica, inclouen les característiques del pacient (edat, presència d'altres infeccions, obesitat, malnutrició i consum de nicotina, entre altres) i les operatives (Taula 4.3.4.).

Taula 4.3.4. *Característiques que influencien en el desenvolupament de SSI* ^[46].

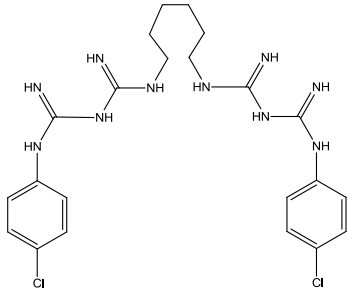
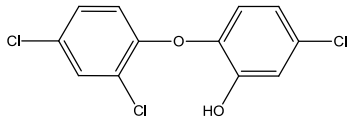
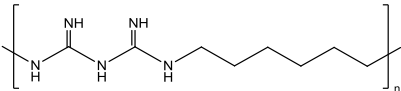
Característiques Operatives	
Factors preoperatoris	Neteja de la pell
	Depilació
	Preparació de la pell
	Desinfecció de mans i avantbraços
	Personal quirúrgic infectat
	Tractament de prevenció antimicrobiana
Factors intraoperatoris	Esterilització instrumental inadequada
	Ambient del quiròfan
	Vestimenta quirúrgica
	Durada de l'operació
	Tècnica quirúrgica
	Drenatges quirúrgics
Factors postoperatoris	Presència de material no quirúrgic
	Cura de la ferida
	Planificació de l'alta

Les sutures són susceptibles d'incrementar la infecció d'una ferida. El grau de contaminació depèn de la configuració física i química de la sutura^[47]; sent major en sutures multifilament i absorbibles d'origen natural. L'adhesió de bacteres a les sutures, i especialment als filaments entrelaçats de sutures multifilament, juga un paper important en la inducció d'infeccions^[48]. Els microorganismes poden arribar a formar biofilms, que a més de potenciar la infecció, creen una matriu protectora, fent que les bacteres siguin difícils de tractar amb antibiòtics i antisèptics^[49]. La capil·laritat de la sutura també és un factor important alhora d'avaluar la infecció, ja que està relacionat amb la capacitat de la sutura a transportar i transmetre bacteres^{[37],[44]}.

L'interès per les sutures antimicrobianes, neix de la necessitat de reduir l'adhesió i el risc de contaminació per bacteres en la sutura, i conseqüentment, disminuir la infecció de la ferida. Les estratègies preventives existents inclouen antibiòtics profilàctics abans de que es puguin formar biofilms, i superfícies intel·ligents que impedeixen la colonització o que tenen propietats antimicrobianes^[50]. El tractament amb antibiòtics acostuma a ser prolongat amb la conseqüent aparició de resistència microbiana, per això s'opta per una teràpia amb antisèptics. Aquests han de ser biocompatibles amb els productes mèdics, no influenciar en el processos de curació i tolerats en les ferides sense provocar toxicitat.

En la *Taula 4.3.5.* es presenten els antisèptics més utilitzats actualment.

Taula 4.3.5. Antisèptics potencials per a ser carregats superficialment^{[50],[51],[52]}.

Antisèptic	Estructura química	Pes molecular [g/mol]	Usos
Clorhexidina (CHX)		505,45	Desinfecció de ferides Bany preoperatori Neteja de material preoperatori Impregnació de dispositius Desinfecció oral, cremades, ferides i vaginal.
Triclosan (TCS)		289,5	Desinfecció oral Sabons desinfectants Rentats quirúrgics Productes comercials (cosmètics, desodorants, esponges, etc.)
Polihexametilen biguanida (PHMB)		2000-2600	Desinfecció de ferides Rentat d'estrís mèdics i dentals Neutralització d'olors Productes comercials (cosmètics, cura personal, suavitants, solucions per a lents de contacte, etc.)

L'ús de dispositius recoberts amb substàncies antimicrobianes, han estat àmpliament emprats per cirurgians ortopèdics^[53]; i en els últims anys, han sortit al mercat una sèrie de sutures antimicrobianes: Vicryl™ Plus, Monocryl™ Plus, PDS™ Plus, Visorb® Plus, Monoswift® Plus i Mono-Dox® Plus^{[40],[54]}. Els tres primers productes, desenvolupats per *Ethicon*, estan carregats amb Triclosan; mentre que els tres últims, creats per *CP Medical*, són d'ús exclusiu en veterinària i estan carregats amb clorhexidina.

S'han realitzat nombrosos estudis sobre l'eficàcia de les sutures carregades amb triclosan. Alguns d'ells corroboren la seva eficiència impedit la colonització bacteriana en la ferida^{[55],[56]}, altres no veuen diferències significatives^[57], i fins i tot hi han que demostren que les sutures carregades amb triclosan no presenten eficàcia en la inhibició de bacteris; és més, sembla tenir efectes adversos en la cicatrització de les ferides^[58].

Així doncs, degut a la absència d'una sutura carregada amb clorhexidina d'aplicació humana, i a les diverses controvèrsies de les sutures carregades amb triclosan, en el present projecte s'ha optat per un estudi emprant clorhexidina com agent antibacterià.

4.3.3.1. Clorhexidina

La clorhexidina, una bisguanida catiònica, és un antimicrobià que ha estat emprat com antisèptic d'ampli espectre en medicina des de 1954. Arriba a la seva màxima activitat a pH 8, el seu efecte disminueix a mesura que baixa el pH i perd l'activitat bactericida per sota d'un pH de 5,2^[59].

L'activitat antimicrobiana de la clorhexidina és més lenta que la dels alcohols. Els efectes que es produeixen depenen també del tipus d'espècie microbiana. La seva eficàcia contra bacteris Gram-positius és bona, disminueix contra bacteris Gram-negatius i fongs, i és poc o gens eficaç contra micobacteris^[60]. El seu mecanisme d'acció tant pot ser bacteriostàtic (inhibició del creixement bacterià) com bactericida (destrucció de bactèries), depenent de la concentració.

La clorhexidina interacciona amb els grups fosfat de la paret cel·lular, alterant l'equilibri osmòtic. En baixes concentracions dóna com a resultat la pèrdua dels constituents citoplasmàtics de baix pes molecular, mentre que en concentracions elevades determina la coagulació del citoplasma, el que ocasiona la mort cel·lular^[61](Figura 4.3.3.).

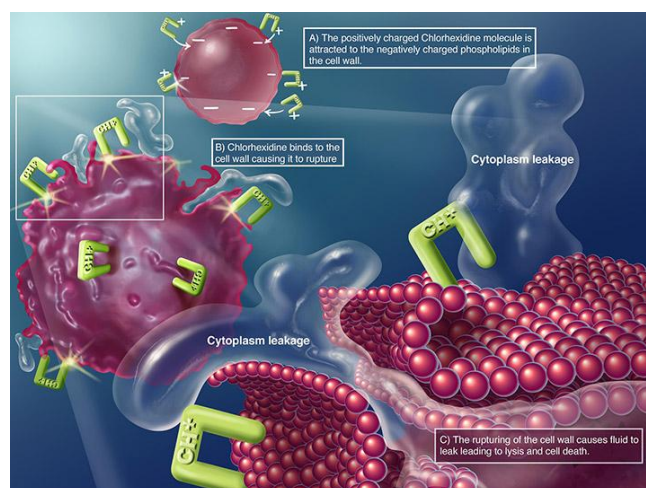


Figura 4.3.3. Mecanisme d'acció de la CHX.

La clorhexidina s'utilitza àmpliament en desinfecció preoperatòria de la pell, ferides (incloent cremades), neteja general de la pell i rentat quirúrgic. En productes orals, disminueix eficaçment la formació de placa i controla la gingivitis. Presenta una forta afinitat d'unió a pell i a membranes mucoses, proporcionant una activitat perllongada (veure Taula 4.3.5.).

Dotar una sutura amb activitat antimicrobiana, és un al·licient per a la creació de nous estudis enfocats a afegir valor a les sutures.

4.3.3.2. Captopril

En la realització d'aquest Projecte Fi de Carrera també s'ha volgut equipar a la sutura d'activitat cicatritzant; fet que afavorirà a què la ferida es curi més ràpidament actuant directament en la disminució d'infeccions. El fàrmac utilitzat per als assajos ha estat el captopril.

El Captopril (àcid (2S)-1-[(2S)-2-metil-3-sulfanilpropanoil] pirrolidina-2-carboxílic, *Figura 4.3.4.*) és un fàrmac antihipertensiu, inhibidor de l'enzim convertidor d'angiotensina. Aquest compost s'utilitza en tractaments d'insuficiència cardíaca, després d'un infart de miocardi i per preservar la funció renal en la nefropatia diabètica^[62], entre altres.

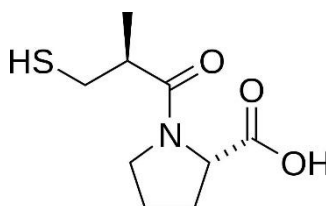


Figura 4.3.4. Estructura química del Captopril.

El sistema renina-angiotensina actua sobretot en la regulació de l'equilibri hidroelectrolític i de la pressió arterial. També realitza funcions en la paret vascular, del miocardi, del ronyó, del sistema nerviós i del teixit adipós. La participació del sistema renina-angiotensina en la contribució al desenvolupament de malalties cardiovasculars, ha portat a un intens estudi per tal de bloquejar aquest sistema mitjançant els IECA (Inhibidors de l'Enzim Convertidor d'Angiotensina). La renina és un enzim que catalitza la hidròlisi de la molècula angiotensinogen, produint angiotensina I que, per acció d'enzims convertidors d'angiotensina, es transforma en angiotensina II. L'angiotensina II actua com a vasoconstrictor en el organisme; estimulant la secreció de vasopressina, que alhora estimula la reabsorció a nivell renal d'aigua; i estimulant de la secreció d'aldosterona, una hormona que augmenta la reabsorció de sodi a nivell renal.

El mecanisme d'acció dels IECA (*Figura 4.3.5.*) és la inhibició de l'ECA tant tissular com circulat, que és l'enzim responsable de la conversió d'angiotensina I a angiotensina II, i en conseqüència, al bloqueig de la cascada del sistema renina-angiotensina. Aquesta acció es dona al interaccionar amb l'àtom de zinc que conté l'ECA en el seu centre actiu i que és el lloc d'unió de la angiotensina I. D'aquesta manera, el captopril disminueix les respostes a l'angiotensina II, impedit la transformació d'angiotensina I a II, però no impedeix les accions de la angiotensina II que es pugui formar per una altra via diferent^[63].

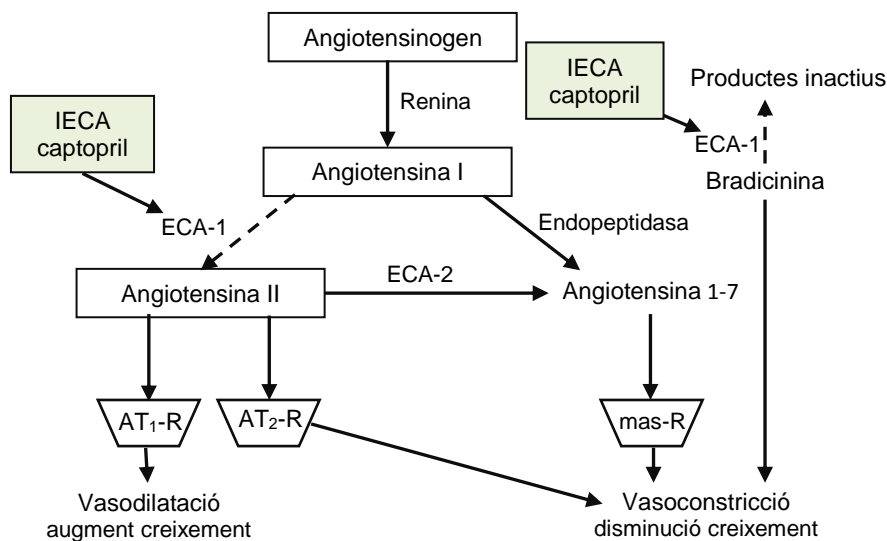


Figura 4.3.5. Mecanismes d'acció dels inhibidors de l'enzim convertidor d'angiotensina (IECA)^[63]. AT₁-R: receptor del tipus AT₁; AT₂-R: receptor del tipus AT₂; ECA-1: enzim convertidor de l'angiotensina I; ECA-2: enzim convertidor de l'angiotensina II; mas-R: receptor del tipus mas.

4.4. Antecedents

La ciència de polímers ha contribuït, de manera significativament important, al desenvolupament de biomaterials sintètics per aplicacions en el camp de la biomedicina; concretament, en sutures bioabsorbibles. *Davis & Geck* van ser els primers en comercialitzar sutures quirúrgiques absorbibles basades en poli(àcid glicòlic), amb el nom de *Dexon*[®]. Anys més tard, l'empresa *Ethicon*, desenvoluparia una sutura formada per un copolímer estadístic de L-lactida i glicolida^[64] (*Vicryl*[®], 1974); i darrera d'aquesta, patentaria un nou polímer sintètic biodegradable, la poli(*p*-dioxanona), originant la primera sutura sintètica monofilament absorbible^[65] (*PDS*[®], 1977). Posteriorment, es van estudiar diferents copolímers amb l'objectiu d'optimitzar les propietats dels materials de sutura. D'aquests assajos van sortir un gran nombre de sutures absorbibles amb aplicacions específiques, com ara el *Monocryl*[®] (*Ethicon*, 1991)^[66] i el *Monosyn*[®] (*B. Braun Surgical*, 1998)^[67], entre altres.

La incorporació de compostos actius en els fils de sutura ha sigut un dels temes a desenvolupar en els últims anys. *Ethicon* ha estat la primera empresa en comercialitzar una sutura amb activitat antibacteriana, *Vicryl*[®] Plus, on el compost actiu (triclosan) s'addiciona a la solució de polímer emprat per a recobrir el fil. *Barbolt* va demostrar la seguretat d'aquesta sutura per a ús clínic^[68]. *Rothenburger et al.* van confirmar la eficiència antimicrobiana de la sutura *Vicryl*[®] Plus, en la prevenció de la colonització *in-vitro* per *S. aureus* i *S. epidermitis*^[55].

Baracs *et al.* no van trobar diferències significatives entre sutures de PDS[®] II (sense compost actiu) i PDS[®] Plus (amb triclosan)^[57].

El grup Polimers Sintètics, Estructura i Propietats (PSEP) va aprofundir en l'estudi de sutures quirúrgiques, presentant una Tesis Doctoral (Raül Zurita, *Microestructura, Propiedades y Aplicaciones médicas de materiales poliméricos biodegradables*, 2008). En dos de les quatre publicacions científiques que sorgiren d'aquest treball, s'estudiava l'alliberació de triclosan incorporat en el recobriment de sutures multifilament de poliglicolida, i la incorporació i alliberació d'ibuprofè en sutures quirúrgiques multi i monofilars. En la primera publicació mencionada, es va preparar un copolímer de lactida, ϵ -caprolactona i carbonat de trimetilè 10:60:30 (3% *p/v*) per a ser emprat com a recobriment. L'antibacterià es va afegir al copolímer utilitzat com a recobriment d'un fil de poliglicòlic multifilar. En el treball, s'avalua l'alliberació en diferents medis, la influència de la temperatura, el diàmetre del fil i la concentració de triclosan en el bany. Els resultats obtinguts indiquen que en medis hidrofòbics, el procés d'alliberació no és total, sinó que es para al arribar a un estat d'equilibri^[69]. En la segona publicació, es va carregar ibuprofè en l'interior de fils monofilars de poli(*p*-dioxanona) USP 1 mitjançant un procés de difusió. S'estudia l'alliberació en medi Sørensen i es determinaren les corresponents cinètiques. També s'incorpora el fàrmac en sutures de poliglicòlic multifilar, conjuntament amb el polímer de recobriment^[70].

5. Material i mètodes

5.1. Polimerització per obertura d'anell

5.1.1. Materials

Els monòmers emprats van ser el carbonat de trimetilè (*Boehringer Ingelheim*) i la lactida (3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione, *SIGMA-ALDRICH*). Es va fer servir octanoat d'estany ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, *SIGMA-ALDRICH*) com a catalitzador, i cloroform de grau analític com a principal dissolvent (*Panreac*).

Per a la silanització es va utilitzar una solució de silanització tipus I (*SIGMA-ALDRICH*).

5.1.2. Síntesi del copolímer LA-co-TMC

La síntesi es va dur a terme en un tub prèviament silanitzat per tal d'evitar la reacció química entre els monòmers i els grups hidròxid presents en el vidre. La part interna del tub de polimerització es va mantenir en contacte amb la solució de silanització durant 30 minuts en agitació magnètica. Un cop passats els 30 minuts, el tub es va rentar tres cops amb metanol anhidrid i es va assecar en una estufa preescalfada (24 h a 120°C).

El copolímer es va sintetitzar mitjançant un procés de polimerització en massa per ROP a partir dels seus respectius monòmers cíclics (*Taula 4.1.2.*). Prèviament a la reacció, els monòmers es van assecar a temperatura ambient durant 2 hores al buit, per eliminar els residus d'aigua. Per tal d'obtenir 30 g de copolímer estadístic LA-co-TMC 35:65 wt%, es van introduir 10,5 g de LA i 19,5 g de TMC dins el tub de vidre amb base rodona resistent al buit i proveït d'un imant. A continuació, es va afegir el catalitzador amb una relació monòmer/catalitzador de 1000 (1 mol de catalitzador per cada 1000 mols d'unitat de monòmer), el que representa un total de 0,115 mL de catalitzador, i es va tancar el tub amb sèptums de goma en atmosfera de nitrogen, durant 30 minuts. Mantenint l'atmosfera inert, es va introduir el tub en un bany de silicona preescalfat a 130°C i es va deixar polimeritzar 48 hores. Degut a l'augment de la viscositat, la mescla es va deixar d'agitar abans de que es completés el temps de polimerització, i finalment es va transformar en una massa sòlida.

Completada la polimerització, el tub es va refredar fins a temperatura ambient i el copolímer obtingut es va dissoldre en cloroform i es va precipitar en metanol. El material recuperat es va rentar diverses vegades amb metanol, i es va assecar i emmagatzemar al buit.

5.2. Càrrega de fàrmacs en la sutura Monosyn®

5.2.1. Materials

La incorporació dels fàrmacs es va realitzar en sutures Monosyn® USP 0, subministrades per *B. Braun Surgical S.A.* En algunes experiències es va recobrir la sutura amb un copolímer preparat a partir de LA i TMC en proporcions de pes 35:65 (Apartat 5.1.2).

El compostos estudiats amb activitat farmacològica va ser la clorhexidina (*Chlorhexidine diacetate hydrate 98%, ACROS ORGANICS*) i el captopril ($\geq 98\%$ *SIGMA-ALDRICH*).

Els dissolvents emprats van estar l'acetat d'etil (*ethyl acetate synthesis grade, Scharlau*) i l'etanol (*Ethanol absolute ACS BASIC, Scharlau*).

5.2.2. Incorporació del fàrmac

La càrrega de fàrmac (clorhexidina i captopril, per separat) es va realitzar mitjançant dos mètodes. En el primer mètode, s'obté la incorporació del fàrmac en la superfície de la sutura per adsorció. La metodologia seguida va consistir en submergir, durant 5 segons, els fils de sutura en una dissolució d'etanol amb quantitats variables de fàrmac (0,1; 1; 5; 10 i 15% *p/v*). Tot seguit, les mostres es van assecar amb un bufador de flux d'aire calent (10-15 segons) i posteriorment al buit, en un dessecador. En el segon mètode, es va afegir el recobriment de LA-co-TMC 35:65 als fils de sutura, després de la incorporació del fàrmac. S'ha d'indicar que ha sigut impossible treballar amb un solvent volàtil comú per al fàrmac i el recobriment de forma que es pogués utilitzar un únic bany. Per tant, les mostres es van introduir durant 5 segons en una segona dissolució del copolímer en acetat d'etil (3% *p/v*). Anàlogament, es van assecar i emmagatzemar al buit.

Totes les immersions es van realitzar en banys independents i en contínua agitació (250 rpm) per assegurar homogeneïtat alhora de carregar i recobrir els fils de sutura.

Mitjançant aquests dos mètodes, el fàrmac es va dipositar superficialment en la sutura, quedant directament en contacte amb l'ambient en un cas, i en l'altre recobert pel copolímer sintetitzat.

5.3. Caracterització físico-química

5.3.1. Cromatografia de permeació en gel (GPC)

La cromatografia de permeació en gel (*Gel Permeation Chromatography, GPC*) és un tipus de cromatografia sòlid-líquid que separa els polímers polidispersos en fraccions per tamisat

mitjançant un gel. El gel, que fa el rol de fase estacionària, presenta una gran varietat de mides de porus (1 a 10^6 nm). Les fraccions de pes molecular més alt es separen abans, ja que les petites travessen més fàcilment les partícules de gel. D'aquesta manera, la GPC separa les fraccions d'acord amb la seva grandària.

A la sortida de la columna es registra la variació entre l'índex de refracció del dissolvent de partida y la fracció recollida, això aporta una mesura del número de molècules que s'estan eluint. Per conèixer els valors dels pesos moleculars és necessari realitzar un calibrat amb patrons de pes molecular conegut.

La distribució del pes molecular de polímers influeix en molts paràmetres físics dels materials tals com la força, la rigidesa y la resistència química.

L'experiència es va executar en un cromatògraf *Shimadzu* model *LC-20AD* equipat amb un programa de tractament de dades *LCSolution*. Es va emprar una columna de gel de $9\text{ }\mu\text{m}$ PL HFTIP (*Polymer Lab* $300\times 7,5\text{ mm}$) a 40°C i un detector d'índex de refracció (*Shimadzu RID-10A*).

Les mostres, de concentració 2 mg/mL , es van dissoldre en 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol contenint CF_3COONa ($0,05\text{ M}$) i es van injectar $20\text{ }\mu\text{L}$ a la columna (velocitat de flux de 1 mL/min).

Les dades que s'obtenen, els pesos moleculars mitjos en número (M_n) i en pes (M_w), i l'índex de polidispersitat (PD), es van calcular emprant patrons de PMMA.

numero de molècules amb pes molecular

5.3.2. Calorimetria Diferencial de Rastreig (DSC)

La calorimetria diferencial de rastreig (*Differential Scanning Calorimetry*, *DSC*) és un tècnica que determina les temperatures i els fluxos de calor associats amb les transicions tèrmiques d'un material com una funció del temps (estudis isotèrmics) i la temperatura (estudis no isotèrmics). L'anàlisi tèrmic permet la identificació, control de puresa i estabilitat de les substàncies.

Aquesta eina mesura la diferència de flux de calor entre la mostra i en la referència mentre la temperatura de la mostra canvia a un ritme constant. La calor flueix simultàniament cap a la cel·la que conté la mostra i cap a la del material de referència. La diferència de l'energia d'entrada necessària per a què la temperatura de la mostra coincideixi amb la temperatura

del material de referència, seria la quantitat d'excés de calor absorbida o alliberada per la molècula en la mostra (durant un procés endotèrmic o exotèrmic, respectivament).

En el camp dels polímers es poden determinar transicions tèrmiques com la temperatura de transició vítria T_g , la temperatura de fusió T_m , la temperatura de cristal·lització T_c , estudis de compatibilitat de polímers, reaccions de polimerització i processos de curat.

Els assajos es van realitzar amb un calorímetre de flux de calor *TA Instruments* model *Q100 DSC*. L'aparell dota d'un sistema automatitzat amb capacitat per a 50 mostres i 5 referències, i d'un sistema de refrigeració mecànica (*Refrigerated Cooling System, RSC*) el qual permet treballar en un rang de temperatures comprés entre $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $550\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les mostres tractades van ser d'aproximadament 5 mg, el calibrat dels valors d'entalpia i temperatura es va portar a terme amb patrons d'indi ($T_m=429,75\text{ K}$, $\Delta H_m=3,267\text{ KJ/mol}$), i el de la T_{ZERO} es va realitzar mitjançant dos experiments, el primer fet sense mostres i el segon amb discs de safir, permetent l'obtenció d'una línia base òptima.

El protocol seguit ha consistit en una sèrie d'escombrats consecutius que es detallen a continuació. En el escombrat es produeix un escalfament de la mostra, des de temperatura ambient fins a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocitat de $20\text{ }^{\circ}\text{C/min}$. D'aquesta manera s'obté la T_m , la qual es manifesta com un pic endotèrmic relativament ample, així com el grau de cristal·linitat de la mostra. Seguidament, es refreda la mostra lentament fins una temperatura de $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocitat de $10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ (segon escombrat). Aquesta etapa permet determinar la cristal·lització del fos, a partir d'un pic exotèrmic (T_c). El tercer escombrat consisteix en un segon escalfament a $20\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ de velocitat. Aquest fet permet constatar la capacitat de reproducció de les transicions i, alhora, obtenir dades de la mostra cristal·litzada. Per acabar, es realitza un últim escalfament després d'un refredament ràpid de la mostra (*quenching*) a la velocitat màxima permesa per l'aparell. Aquest darrer pas permet conèixer la T_g dels polímers i la cristal·lització en fred (*cold crystallization*).

5.3.3. Espectroscòpia infraroja (FT-IR)

L'espectroscòpia infraroja és una tècnica per a la determinació estructural basada en l'excitació vibracional (tensió o flexió) de les molècules per l'absorció de la radiació infraroja. L'excitació de tensió implica canvis en la freqüència de vibració dels àtoms entrellaçats al llarg de l'eix d'enllaç, mentre que la deformació per flexió implica moviment dels àtoms fora de l'eix d'enllaç.

La regió IR de l'espectre electromagnètic es troba entre $12800\text{--}10\text{ cm}^{-1}$, i es pot dividir en tres zones: IR proper (NIR): $12800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$; IR mitjà: $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$; IR llunyà: $400\text{--}10\text{ cm}^{-1}$, sent en el IR mitjà on es troben la majoria d'aplicacions analítiques. L'espectroscòpia IR

presenta una gran versatilitat, ja que permet estudiar pràcticament qualsevol mostra independentment de l'estat en el que es trobi.

Així doncs, un espectre IR s'obté al passar radiació a través d'una mostra i determinar quina fracció d'aquesta radiació incident ha estat absorbida. L'energia particular a la que apareix cada pic en l'espectre està relacionat amb la freqüència de vibració d'una part de la molècula.

Els espectres IR es van efectuar en un espectrofotòmetre de transformada de Fourier, *Jasco FT-IR 4100* (*Fourier Transform Infrared Spectrophotometer*, *Figura 5.3.1.*), rang espectral entre 500-4000 cm^{-1} . L'equip dota d'un accessori de reflexió total atenuada, *ATR Specac model MKII Golden Gate Heated Single Reflection Diamond*, a més d'un controlador de temperatura d'alta estabilitat *West 6100+*, que permet registrar espectres fins a una temperatura de 200°C. Les mostres es van col·locar entre el suport de diamant i el cristall de safir, obtenint els espectres a estudiar amb el software *Spectra Manager*.



Figura 5.3.1. Espectrofotòmetre Jasco FT-IR 4100 i l'accessori ATR Specac MK II Golden Gate Heated Single Reflection Diamond.

5.3.4. Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN)

L'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear és una eina que s'utilitza per complementar altres tècniques espectroscòpiques, donant informació sobre l'estructura carboni-hidrogen d'una molècula. S'utilitza en la identificació, anàlisi quantitatiu, estudi de configuració de cadena i microestructura de polímers, caracterització i quantificació de la tacticitat, i en la determinació del pes molecular.

La tècnica de RMN fa ús de la propietat de l'espín (moment angular i el seu moment magnètic associat) que posseeixen els nuclis amb número atòmic i màssic no parells. Al aplicar un camp magnètic, aquests nuclis s'orienten i romanen en un estat de mínima energia. El canvi d'orientació provocada per una radiació electromagnètica a una freqüència específica, porta a una absorció d'energia que depèn de l'entorn magnètic en el que es troba cada nucli; l'estat de mínima energia inverteix el seu espín a l'estat de màxima energia. Quan succeeix la inversió de l'espín, es diu que els nuclis magnètics estan en ressonància amb la radiació aplicada. La majoria d'estudis es basen en l'anàlisi dels nuclis ^1H i ^{13}C .

Els espectres RMN de protó (^1H -RMN) es van fer en un espectròmetre *Bruker AMX-300* de transformada de Fourier treballant a 300,13 MHz. Les mostres, de 10 a 20 mg, es van

introduir en tubs de vidre especials per a RMN (3 mm de diàmetre i 10 cm d'alçada), on es van dissoldre amb dimetil sulfòxid (DMSO 0,75 mL) en un bany de silicona a 110°C. Els espectres obtinguts es van processar mitjançant el software *MestReC*.

5.4. Anàlisi Morfològic

5.4.1. Microscopi electrònic de rastreig (SEM)

El microscopi electrònic de rastreig (*Scanning Electron Microscope, SEM*) permet observar i caracteritzar materials orgànics i inorgànics a escala nanomètrica i micromètrica. És un dels instruments més versàtils per examinar i analitzar les característiques microestructurals d'objectes sòlids. La mostra a examinar s'irradia amb un feix d'electrons accelerats amb un voltatge de 1-50 kV entre el càtode i l'ànode, que pot realitzar un escombrat a través de la superfície de la mostra per a produir imatges, o pot obtenir un anàlisi en una posició estàtica. Les senyals produïdes a partir de la interacció del feix d'electrons amb la mostra inclouen electrons secundaris, electrons retrodispersats, raig X característics i altres fotons de diverses energies. Aquestes senyals s'obtenen dels volums d'emissió específics dins de la mostra i permeten examinar moltes característiques, com la topografia superficial, cristal·lografia i composició, entre altres^[71].

Les imatges es van capturar emprant un equip *Focused Ion Beam Scanning Electron Microscope (FIB-SEM) NEON® Series* de Carl Zeiss (*Figura 5.4.1.*). Les mostres es van tallar en diversos trossos representatius i es van col·locar en una base. Abans de sotmetre les mostres al feix d'electrons, es van recobrir amb una fina pel·lícula de carbó mitjançant un revestidor *Mitec K950 Sputter Coater*. Aquest pas es realitza en buit mitjançant sublimació per donar-li propietats conductores a les mostres. Les imatges es van capturar amb el software *SmartSEM*.



Figura 5.4.1. Microscopi (FIB-SEM) NEON® Series de Carl Zeiss.

5.5. Anàlisi de les Cinètiques d'Alliberació

5.5.1. Alliberació de fàrmacs

L'estudi de l'alliberació de clorhexidina i captopril des de la sutura Monosyn[®], sense recobrir i recobrint-la amb LA-co-TMC 35:65 3% *p/v*, es va realitzar amb les mostres descrites a l'apartat 5.2.2.

Es van emprar etanol absolut (*ethanol absolute ACS BASIC, Scharlau*), i una mescla de tampó fosfat salí PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, SIGMA-ALDRICH*) i etanol absolut 30:70 *v/v* com a medis de diferent hidrofobicitat.

Les mostres, de 5 cm cadascuna, es van submergir en un flascó amb 10 mL de medi i es van mantenir a 37 °C en agitació (160 rpm). L'experiència es va realitzar per triplicat i en els dos medis, recollint 1 mL de mostra d'alliberació a diferents intervals de temps, i renovant el mil·lilitre extret per un altre de medi.

La quantitat total de fàrmac incorporat als fils de sutura es va determinar dissolent 1 cm de mostra en 0,5 mL de HFIP, posteriorment es va afegir 0,5 mL d'etanol absolut i finalment es va centrifugar durant 5 minuts. Amb el primer pas s'assegura la total dissolució, tant del fil de sutura com del recobriment i la clorhexidina en HFIP, mentre que en el segon, al afegir etanol precipita tot el material polimèric menys el fàrmac que queda dissolt en la barreja HFIP-Etanol 50:50 *v/v*. Amb la centrifugació s'obté la total separació del precipitat i el sobrenadant, fent més fàcil recollir el sobrenadant per al seu anàlisi. Es van efectuar tres repeticions per a cada mostra. Els valors corresponents a la quantitat total de fàrmac es consideren com la quantitat de clorhexidina inicial que conté la sutura al començar l'alliberació. El procediment descrit es va fer servir també per quantificar el fàrmac no alliberat de cadascuna de les mostres.

Per tal de determinar quantitativament la concentració dels fàrmacs en els medis d'alliberació i en la barreja HFIP-Etanol 50:50 *v/v*, es van preparar tres rectes de calibrat per fàrmac. Es va dissoldre 1 mg de clorhexidina i captopril en 1 mL de cada medi. A continuació es van preparar solucions de diferents concentracions i es van analitzar utilitzant espectroscòpia d'absorció d'UV-Vis.

5.5.2. Espectroscòpia d'Absorció Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

L'espectroscòpia d'absorció Ultravioleta-Visible és una tècnica instrumental d'ampi ús, en la que s'estudia l'absorció per part de la matèria de les radiacions compreses en les zones UV i visible de l'espectre electromagnètic. L'absorció selectiva de radiació produeix l'espectre d'absorció, que proporciona informació fonamental per a la determinació de la composició química, la estructura i les propietats de la matèria. Quan la radiació UV-Vis incideix sobre

una substància, es poden produir diferents fenòmens: reflexió, transmissió i absorció. L'absorció està associada a la transició d'electrons entre orbitals de les últimes capes. Aquesta es produeix quan un fotó, amb la energia adequada, xoca amb un electró que absorbeix aquesta energia per saltar a un nivell electrònic superior, obtenint un estat d'excitació. Així doncs, la espectroscòpia UV-Vis dona informació sobre les diferències d'energia entre els nivells electrònics, és a dir, proporciona informació fonamental per conèixer l'estructura electrònica de la matèria.

Les mostres es van analitzar en un espectrofotòmetre UV-Vis *SHIMADZU UV-3600* de doble feix (*Figura 5.5.1.*), en un rang de longitud d'ona entre 185-350 nm. L'equip disposa de capacitat per a col·locar dues cubetes, una com a referència (medi) i l'altra per a les mostres. Abans d'estudiar les mostres, s'ha de fer una línia base amb medi en ambdós cubetes. El tractament de dades dels espectres es va determinar mitjançant el programa *UVProbe*.



Figura 5.5.1. Espectrofotòmetre UV-Vis SHIMADZU UV-3600.

5.6. Anàlisi Biològic

La valoració de l'efecte de clorhexidina carregada en la sutura Monosyn® com agent antibacterià i citocompatible, així com el de captopril com agent citocompatible i cicatriç, es van fer amb les mostres descrites a l'apartat 5.2.2.

5.6.1. Cultius Bacterians

Els estudis d'inhibició i adhesió bacteriana es van realitzar amb les bacteries *Escherichia Coli* (*E. coli*, CECT 101) i *Micrococcus Luteus* (*M. luteus*, CECT 245), del tipus Gram-negativa i Gram-positiva respectivament, ambdues bacteries es van obtenir de la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT, València, Espanya) (*Figura 5.6.1.*).

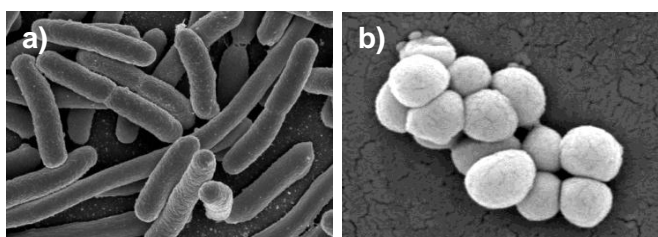


Figura 5.6.1. Morfologia de les bacteries a) *E. coli* i b) *M. luteus*.

El medi de cultiu bacterià emprat va ser el LB (*Luria Bertani, Scharlau*), el qual està format per 10 g/L de triptona, 5 g/L d'extracte de llevat i 5 g/L de clorur sòdic dissolts en aigua destil·lada. El pH del medi es va ajustar a $7,0 \pm 0,2$ i es va esterilitzar al autoclau ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 30 minuts). A partir dels estàndards de terbolesa de *McFarland* (mescla de clorur de bari al 1% i àcid sulfúric al 1%) es va determinar la concentració bacteriana en el medi, i es va realitzar la corresponent dilució per tenir el número de bactèries (UFC/mL) desitjades per portar a terme l'estudi: 100 bactèries/mL.

A la *Figura 5.6.2.* es mostra la corba típica de creixement bacterià. La fase de latència és la fase d'adaptació dels microorganismes; en ella es produeixen els enzims necessaris per a que puguin créixer en el nou medi. Pel que fa a la fase exponencial o logarítmica, els microorganismes creixen exponencialment. Cada cop que passa un temps de generació la població es duplica (2^n , on n és el número de generacions de bactèries). Sota condicions idònies, la velocitat de creixement és màxima. En la fase estacionària, el creixement s'atura. Les limitacions de creixement ocorren per esgotament de nutrients essencials, per acumulació de productes tòxics o per una combinació d'ambdós causes. Finalment, la fase de mort, és aquella en la que es produeix una disminució progressiva en el número de microorganismes.

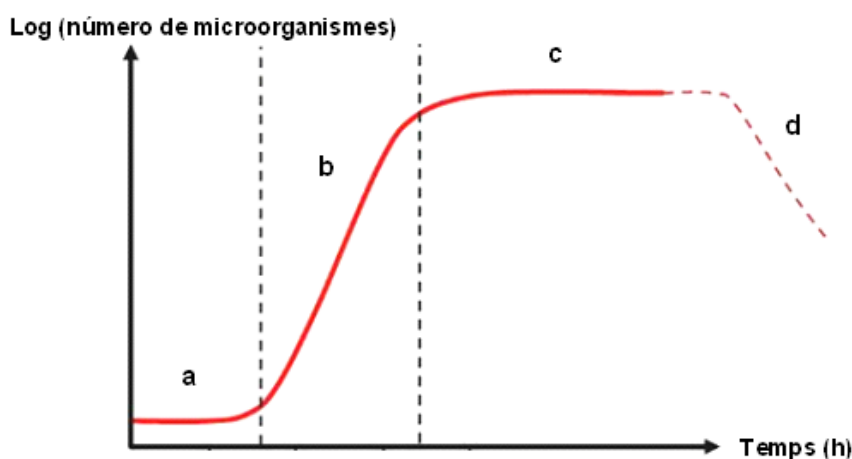


Figura 5.6.2. Corba de creixement d'una població bacteriana: a) Fase de latència, b) Fase exponencial, c) Fase estacionària i d) Fase de mort.

5.6.1.1. Inhibició bacteriana

Per tal de determinar quantitativament el creixement bacterià, es van sembrar 100 UFC (unitats formadores de colònies) en 1 mL de medi de cultiu en presència de les diferents mostres (5 cm cadascuna) i controls (sutura sense agent antimicrobià, control positiu amb bactèries, i control negatiu amb el medi únicament), en plaques de poliestirè de 24 pous. Abans però, les mostres es van radiar amb llum UV 10 minuts per esterilitzar-les. A continuació, es van prendre mostres cada dos hores (0,1 mL), durant vuit hores, per finalitzar amb una a les 24 h i una altra a les 48 h. Els cultius es van incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en

agitació (160 rpm). Les mostres originades es van quantificar per determinar el creixement bacterià amb un equip lector de microplaques *EZ-READ 400 ELISA* (Figura 5.6.3.), obtenint senyals d'absorbància mitjançant el software *ADAP* (*Measurement filter*: 450 nm, *Reference filter*: 650 nm). El creixement bacterià es va calcular com el percentatge relatiu al creixement en el control positiu.



Figura 5.6.3. Equip EZ-READ 400 ELISA.

La inhibició bacteriana també es va voler avaluar qualitativament mitjançant plaques d'agar. Al voltant de les mostres de fil de sutura, degut a la alliberació i difusió en el medi de cultiu del compost antimicrobià, es produeix un halo pel contrast entre la zona de la placa on hi ha formació de colònies i la zona on no es produeix aquest creixement.

Per visualitzar aquest efecte, es van elaborar dos medis de cultiu pesant 7,9 g de *Violet Red Bile Dextrose Agar* (VRBD AGAR, Scharlau) i 10,6 g de *Brilliant Green Agar* (BGA, Scharlau); cada quantitat es va dissoldre en 200 mL d'aigua Mili-Q. Els medis es van esterilitzar en un autoclau, mantenint una temperatura de 121 °C durant 30 minuts. A continuació, es van preparar les plaques Petri introduint 15 mL de cada medi i deixant que l'agar es solidifiqués a temperatura ambient. Un cop fet això es va poder procedir al sembrat dels bacteris pel mètode d'estries escoceses (10^4 UFC/mL). El bacteri *E. coli* es va cultivar en VRBD AGAR, mentre que el *M. luteus* en BGA. Finalment, es van dipositar sobre el agar les diferents mostres (5 cm de longitud) i es van mantenir a 37 °C durant 24 h. Els halos d'inhibició es van fotografiar amb una càmera (*CANON PowerShot G9*) utilitzant un transil·luminador de llum blanca (*MEDALight*).

5.6.1.2. Adhesió bacteriana

Un cop finalitzat l'estudi d'inhibició, es va procedir a l'aspiració del medi i al rentat de cadascun dels pous amb aigua destil·lada (3 cops). Tot seguit se li va afegir 500 µL de tiosulfat de sodi 0,01M, i es van deixar en agitació a 37 °C (160 rpm) durant 1 hora. A continuació es van retirar tots els fils de sutura i es van emmagatzemar amb formol al 2,5%. Als respectius pous, se li va agregar 1 mL de medi de cultiu i a les 24 h es va realitzar la lectura d'absorbància a 650 nm per determinar el creixement bacterià, que és funció del número de bactèries desenganxades dels fils de sutura. Tots els assajos, tant els de inhibició com els d'adhesió, es van realitzar per quadruplicat.

5.6.2. Cultius Cel·lulars

Els cultius de cèl·lules immortalitzades no requereixen del sacrifici d'animals, ni de l'aïllament i purificació cel·lular. Per aquesta raó, s'empren cèl·lules d'aquesta índole en la determinació de biocompatibilitat *in-vitro*. Els estudis de proliferació, adhesió i viabilitat es van realitzar amb la línia cel·lular VERO, cèl·lules epitelials de ronyó de mico verd Africà *Chlorocebus*, i amb la línia MG-63, cèl·lules fibroblasts d'ós humà (Figura 5.6.4.).

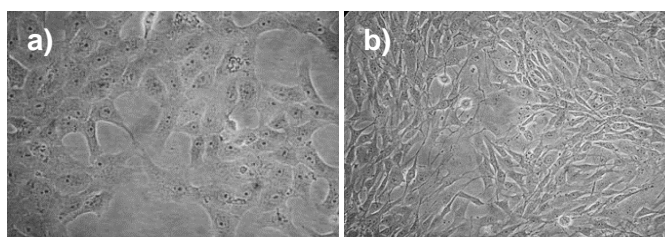


Figura 5.6.4. Morfologia de les cèl·lules a)VERO i b)MG-63.

Les línies cel·lulars es van cultivar en medi de cultiu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) tamponat amb bicarbonat de sodi i suplementat amb 10% de sèrum fetal boví, 50 U/mL de penicil·lina, 50 mg/mL d'estreptomicina i L-glutamina 2 mM (37 °C en atmosfera humida amb 5% de CO₂ i 95% d'aire), fins que el creixement en monocapa va arribar al 75-90% de confluència. Posteriorment, les monocapes cel·lulars es van rentar amb tampó fosfat salí PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x*, SIGMA-ALDRICH) i es van disgregar per incubació amb tripsina-EDTA al 0,25% durant 2-5 minuts a 37 °C. La digestió es va controlar per observació en el microscopi i es va aturar l'activitat de la tripsina afegint medi de cultiu, obtenint una suspensió cel·lular. Aquesta suspensió es va homogeneïtzar pipetejant suaument i es va centrifugar (1500 rpm) durant 2 minuts. Seguidament, el sediment de cèl·lules es va resuspendre en medi de cultiu per realitzar el recompte cel·lular en una cambra de *Neubauer* (Figura 5.6.5.) i establir el percentatge de viabilitat, tot aplicant blau de *trypan* al 4%. Per fer aquest recompte, es van mesclar 100 µL de cèl·lules, 250 µL de medi i 150 µL del colorant dins un *ependorf*. El colorant penetra únicament en les cèl·lules mortes, ja que al tenir la membrana cel·lular malmesa permet el pas del tint a l'interior citoplasmàtic.



Figura 5.6.5. Cambra de Neubauer i el corresponent sistema de recompte.

Els experiments de biocompatibilitat *in-vitro* es van realitzar en suspensions cel·lulars amb una viabilitat igual o major al 95%. Una elevada viabilitat cel·lular inicial és necessària per poder avaluar la proliferació y adhesió en contacte directe amb les mostres. La viabilitat pot disminuir mentre els experiments es van desenvolupant, ja que les mostres en sí, o els productes generats a partir d'elles, poden produir citotoxicitat.

5.6.2.1. Adhesió i proliferació cel·lular

Per tal d'avaluar l'adhesió i la proliferació cel·lular en les diferents mostres i del control (sutura sense fàrmac), es van preparar 5 cm de cadascuna, es van col·locar en plaques de cultiu de 24 pous, i es van esterilitzar amb llum ultravioleta durant 15 minuts dins d'una cabina de bioseguretat tipus II. A continuació, es va dipositar directament sobre els fils de sutura una suspensió cel·lular de 100 µL, amb $5 \cdot 10^4$ cèl·lules per l'adhesió i amb $2 \cdot 10^4$ cèl·lules per la proliferació, i 500 µL de medi de cultiu DMEM. Finalment, les plaques es van incubar en condicions de cultiu (37 °C en atmosfera humida amb 5% CO₂ i 95% d'aire). L'adhesió cel·lular, com a interacció breu entre les cèl·lules i les mostres, es va avaluar a les 24 hores; per a la determinació de la proliferació, l'assaig es va prolongar fins les 96 hores.

L'avaluació de l'adhesió i proliferació es va determinar mitjançant la viabilitat cel·lular per assaig MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli). Les cèl·lules viables, per acció de les deshidrogenases mitocondrials, transformen el reactiu MTT en cristalls de sals de formazan insolubles en medis aquosos. Així doncs, transcorregut el temps d'incubació corresponent a cada assaig, es va afegir 50 µL de MTT (3 mg/mL) a cada pou, i es van mantenir en condicions de cultiu 3 hores. Posteriorment, es va aspirar el medi, es van rentar dos cops amb PBS, i els fils de sutura es van disposar en plaques de cultiu noves. Tant a les plaques on anteriorment s'han realitzat els assajos, com a les que contenen ara els fils, se li van afegir 200 µL d'una mescla de dimetilsulfòxid (DMSO), metanol i aigua (20:70:10 en volum) a cada pou, i es van agitar 15 minuts (37 °C) per dissoldre els cristalls de formazan. Per acabar, es van mesurar les absorbàncies a 575 nm amb l'equip *EZ-READ 400 ELISA*, agafant 100 µL de cada mostra i posant-les en plaques ELISA. Les cèl·lules sobre els fils de sutura i les plaques, es van quantificar tenint en compte que l'absorbància està directament relacionada amb la viabilitat cel·lular. Cada experiència es va realitzar per quadruplicat, i els resultats es van calcular com el percentatge relatiu al control normalitzats per longitud de fil. L'anàlisi estadístic realitzat va ser l'ANOVA, seguit del test de *Tukey* amb un nivell de confiança del 95% ($p < 0,05$).

L'estudi cel·lular d'algunes mostres va concloure amb la fixació de les cèl·lules en els fils de sutura, amb l'objectiu d'obtenir evidències a nivell microscòpic de l'adhesió i la proliferació. El procediment és idèntic al descrit anteriorment, amb la diferència que no es va realitzar l'assaig MTT. Després d'haver succionat el medi i rentat els fils, llavors es va afegir 500 µL de formaldehid al 2,5 % en PBS i les mostres es van deixar 24 hores a 4 °C. Passat aquest

temps, les mostres es van deshidratar progressivament amb una bateria d'alcohols (30°, 40°, 70°, 90° i 100°) a 4 °C durant 30 minuts per a cada rentat. Les mostres deshidratades i seques es van observar mitjançant SEM (apartat 5.6.1).

5.6.2.2. Activitat cicatritzant

L'assaig per a avaluar l'activitat cicatritzant del captopril es va realitzar en una placa de 48 pous, on es van sembrar en cada un 10^5 cèl·lules de la línia VERO (tipus epitelial). El cultiu es va mantenir durant 48 h fins que les cèl·lules van arribar al 100% de confluència. A continuació se'ls hi va realitzar una ferida amb una punta de plàstic estèril (punta de 200 µL de capacitat). Cada pou es va rentar amb PBS per retirar les cèl·lules malmeses per la lesió provocada, i evitar la recolonització de l'espai obert en la monocapa. Finalment, es va afegir 1 mL de medi de cultiu DMEM i es van col·locar les diferents mostres de 5 cm en els respectius pous, prèviament esterilitzades durant 15 minuts amb llum ultravioleta en una cabina de bioseguretat tipus II.

L'experiment es va dur a terme mitjançant inspecció visual del tancament de la ferida amb la realització de microfotografies amb el software µImage Micro Image Analysis (UMIAS). Es va mesurar l'amplada de la ferida a l'inici de l'assaig, i es van realitzar controls cada 24 h aproximadament.

6. Resultats experimentals i discussió

A continuació es presenten els resultats obtinguts de la síntesi i caracterització del copolímer de recobriment; la incorporació i alliberació, en medis de diferent hidrofobocitat, dels fàrmacs clorhexidina i captopril en sutures monofilament Monosyn® –mitjançant dos mètodes–, i per últim, els assajos biològics dels fils de sutura modificats en la seva superfície.

6.1. Copolímer de recobriment

El copolímer de recobriment s'ha emprat en aquest estudi per incorporar-lo al fil de sutura un cop carregada amb els compostos farmacològicament actius, i observar així la seva possible influència en l'alliberació, les propietats tant antibacterianes com cicatritzants i la viabilitat cel·lular. La via d'incorporació ha permès ubicar el fàrmac entre la superfície del fil de sutura i el copolímer de recobriment.

Tant els compostos actius com el recobriment, s'han d'incloure al fil de sutura en la última etapa del procés de fabricació, previ a la seva esterilització i emmagatzematge, perquè les temperatures a la que es sotmet el polímer de sutura durant el processat, podria arribar a degradar-los tèrmicament.

El recobriment s'ha constituït en base a un copolímer amb monòmers de LA i TMC, en proporcions en pes 35:65. La LA presenta una solubilitat elevada en dissolvents orgànics, mentre que el TMC proporciona a la sutura una millora pel que fa a flexibilitat i propietats de maneig. Tot i que la sutura de treball, per la seva naturalesa segmentada, presenta millores respecte a flexibilitat, interessa incrementar aquestes propietats ja que la manipulació i el nuat són dels factors més valorats pels professionals.

6.1.1. Caracterització físico-química

El copolímer de recobriment s'ha caracteritzat mitjançant les tècniques físico-químiques habituals. Amb la cromatografia de permeació en gel, es determina el pes molecular del producte sintetitzat; els valors obtinguts han estat de 50250 g/mol, 82710 g/mol i 1,64 corresponents al pes molecular en número, en pes i a la polidispersitat, respectivament.

La ressonància magnètica nuclear de protó permet quantificar la conversió dels monòmers, així com la composició i identificar la microestructura. En l'espectre de ^1H -RMN (*Figura 6.1.1.*) s'observa la senyal característica de la microestructura estadística a 5,08 ppm referents a les diades $\text{T}\underline{\text{L}}$ i $\underline{\text{L}}\text{T}$, addicional a la corresponent al $-\text{CH}-$ de la unitat d'àcid làctic a 5,20 ppm. Cal esmentar que la unitat d'àcid làctic sempre tindrà un grup adjacent igual a aquest, que prové de la síntesis del copolímer a partir de la lactida. A partir de les àrees que

integren les senyals $L\alpha$ i $T(\beta,\alpha)$ es pot calcular la composició en pes segons l'equació següent:

$$\frac{A_{L\alpha} \cdot PM_{T(\beta,\alpha)}}{A_{T(\beta,\alpha)} \cdot PM_{L\alpha}} \quad \text{Equació 6.1.1.}$$

On A és el valor de l'àrea corresponent i PM el pes molecular de les respectives unitats de carbonat de trimetilè i àcid làctic. El resultat obtingut és un 68% en pes de carbonat de trimetilè, valor que s'ajusta notablement a la proporció teòrica de 65%.

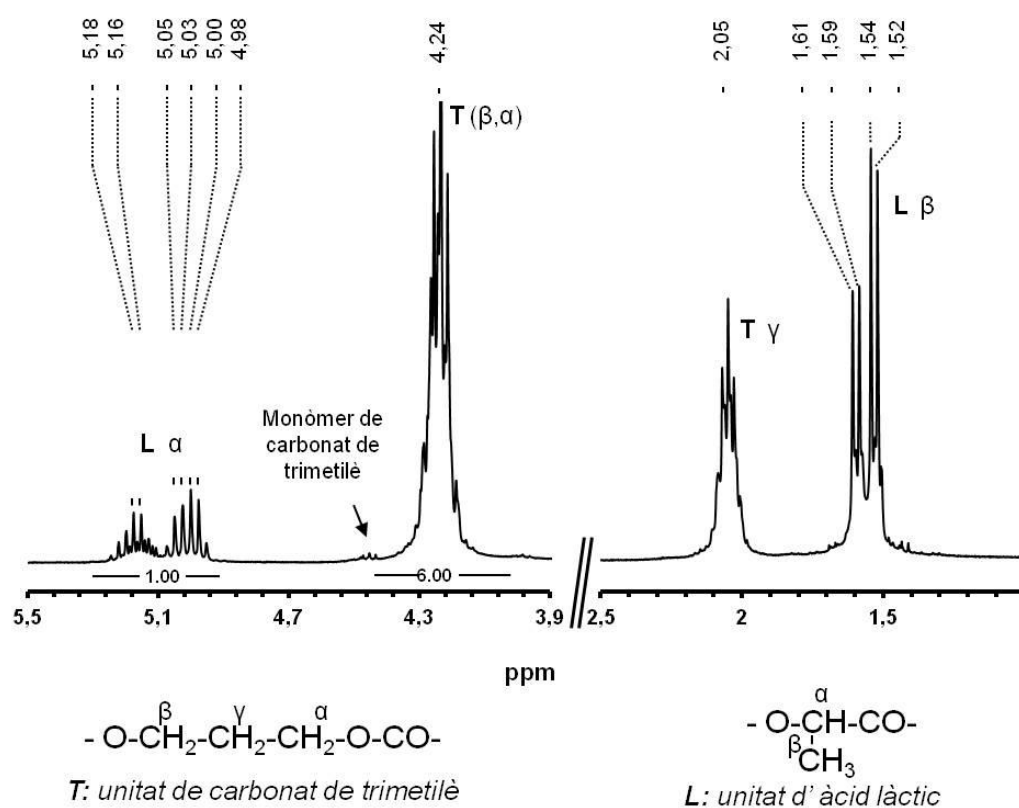


Figura 6.1.1. Espectre de 1H -RMN del copolímer LA-TMC 35:65.

Finalment, es pot dir que la conversió ha sigut pràcticament del 100%, perquè l'àrea de la senyal assignada al monòmer de carbonat de trimetilè és irrellevant respecte les altres senyals del copolímer.

En la *Figura 6.1.2.* es mostra els espectres FT-IR tant del copolímer sintetitzat com dels corresponents homopolímers. En l'espectre resultant del copolímer, es detecten sense modificacions les bandes típiques del poli(carbonat de trimetilè) a 1030 i 788 cm^{-1} . D'altra banda, sí que s'observen diferències en la comparació dels espectres de la polilactida amb el copolímer. En primer lloc, la banda corresponent a PLA en forma cristal·lina α a 867 cm^{-1}

desapareix en el copolímer, tan sols s'intueix una banda que ja es detecta en el PTMC. I en segon terme, es presenten canvis en la zona de 1150 a 970 cm^{-1} . En aquest rang s'observa com la banda de 1081 cm^{-1} assignada a les formes cristal·lines α és molt intensa en el homopolímer i disminueix en el copolímer, mentre que la banda a 1132 cm^{-1} relacionada amb la forma amorfa augmenta d'intensitat.

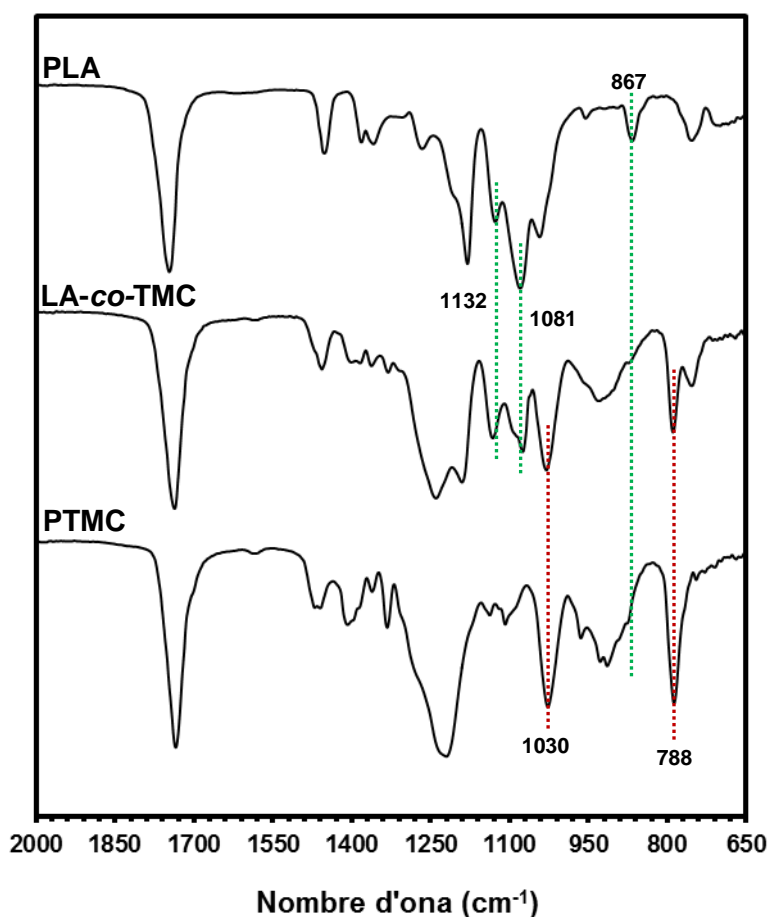


Figura 6.1.2. FT-IR dels homopolimers PLA i PTMC, i del copolímer LA-co-TMC 35:65.

S'ha considerat oportú realitzar un anàlisi calorimètric a la sutura de treball Monosyn® (Figura 6.1.3.) per avaluar les seves característiques tèrmiques. S'observa com el polímer fon al voltant de 200 $^{\circ}\text{C}$; des del fos, refredant apareix un pic de cristal·lització corresponent a la cristal·lització en calent, i escalfant a partir de la mostra refredada ràpidament des de l'estat fos, s'aprecia la cristal·lització en fred. Destacar que l'augment de la T_g en la mostra refredada ràpidament des de l'estat fos, es deu al major contingut de glicolida en la fase amorfa.

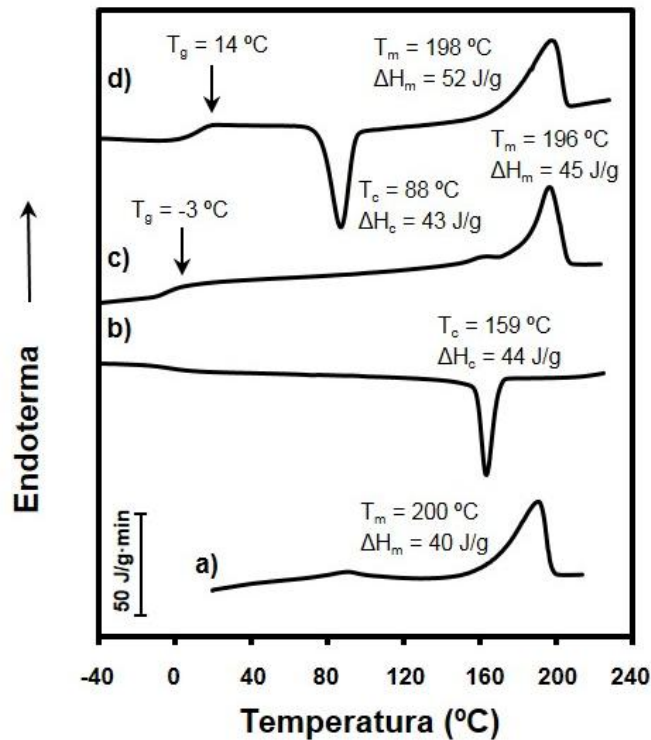


Figura 6.1.3. Escombrats calorimètrics de la sutura Monosyn® a) 1r escalfament, b) 1r refredament, c) 2n escalfament i d) 2n refredament.

Amb l'anàlisi calorimètric de la *Figura 6.1.4.* es detecten les transicions tèrmiques, tant del copolímer, com del fil de sutura emprat.

Pel que fa a la sutura Monosyn®, es presenta l'escombrat relatiu a l'escalfament després de que la mostra sigui refredada ràpidament des de l'estat fos. Tal i com s'espera d'un material semicristal·lí, s'observa un pic de fusió a 198 °C associat als dominis cristal·lins formats per la glicolida present al segment rígid i un pic de cristal·lització al voltant de 88 °C. La presència d'una única temperatura de transició vítria, al voltant dels 14 °C, indica que els diferents segments són completament miscibles.

En comparació amb la sutura, el copolímer sintetitzat no presenta cap pic de cristal·lització i/o fusió, d'acord amb la microestructura estadística obtinguda. Únicament s'observa una temperatura de transició vítria, notablement més baixa degut a la microestructura amorfa, al voltant de -20 °C.

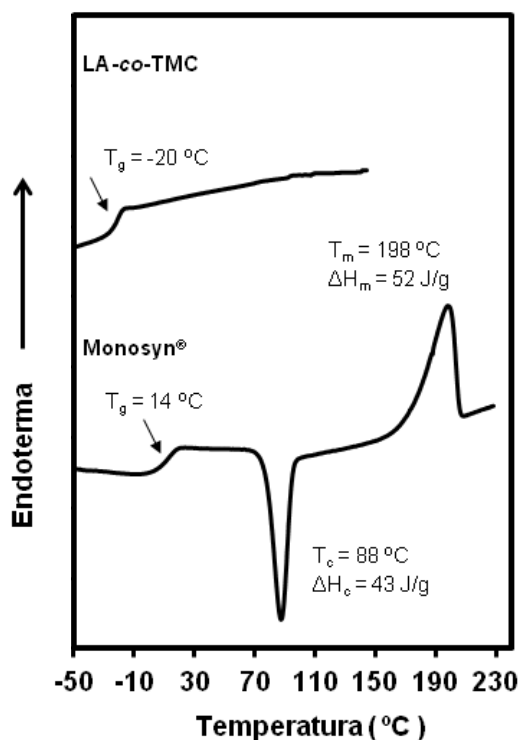


Figura 6.1.4. Escombrats calorimètrics del fil de sutura Monosyn® (inferior) i del copolímer sintetitzat LA-co-TMC (superior) corresponents a l'escalfament a 20 °C/min després de refredar ràpidament des de l'estat fos (quenching)

6.1.2. Optimització del procés de recobriment dels fils de sutura

Abans de procedir a carregar els fils de sutura amb fàrmacs, es va voler optimitzar el procés per recobrir els fils de sutura. Per això, es van realitzar una sèrie d'experiències en les que es va valorar el temps d'immersió i el procés d'assecat. Primerament, es van submergir fils de sutura, durant 2 minuts, en un bany amb una dissolució d'acetat d'etil amb el copolímer de recobriment al 3% i posteriorment, es van assecat de tres maneres: en una estufa a 37 °C, 120 °C i utilitzant un bufador d'aire calent (10-15 segons). Tots els assajos es van fer per triplicat.

Els fils s'han examinat en el microscopi electrònic de rastreig (SEM, apartat 5.4.1.) per observar la morfologia i homogeneïtat del recobriment. S'ha comprovat que, respecte al assecat, el mètode que dona més bons resultats és l'ús del bufador d'aire (*Figura 6.1.5*). Assecant els fils de sutura en les estufes, el recobriment queda esquerdat pel fet que l'assecat es produeix més lentament. Doncs, és necessari que l'assecat del recobriment sigui imminent a la sortida del bany de recobriment. Un altre factor a examinar va ser el temps d'immersió; observant les fotografies obtingudes (*Figura 6.1.6*) es pot concloure que el millor resultat s'obté a un temps de 5 segons d'immersió.

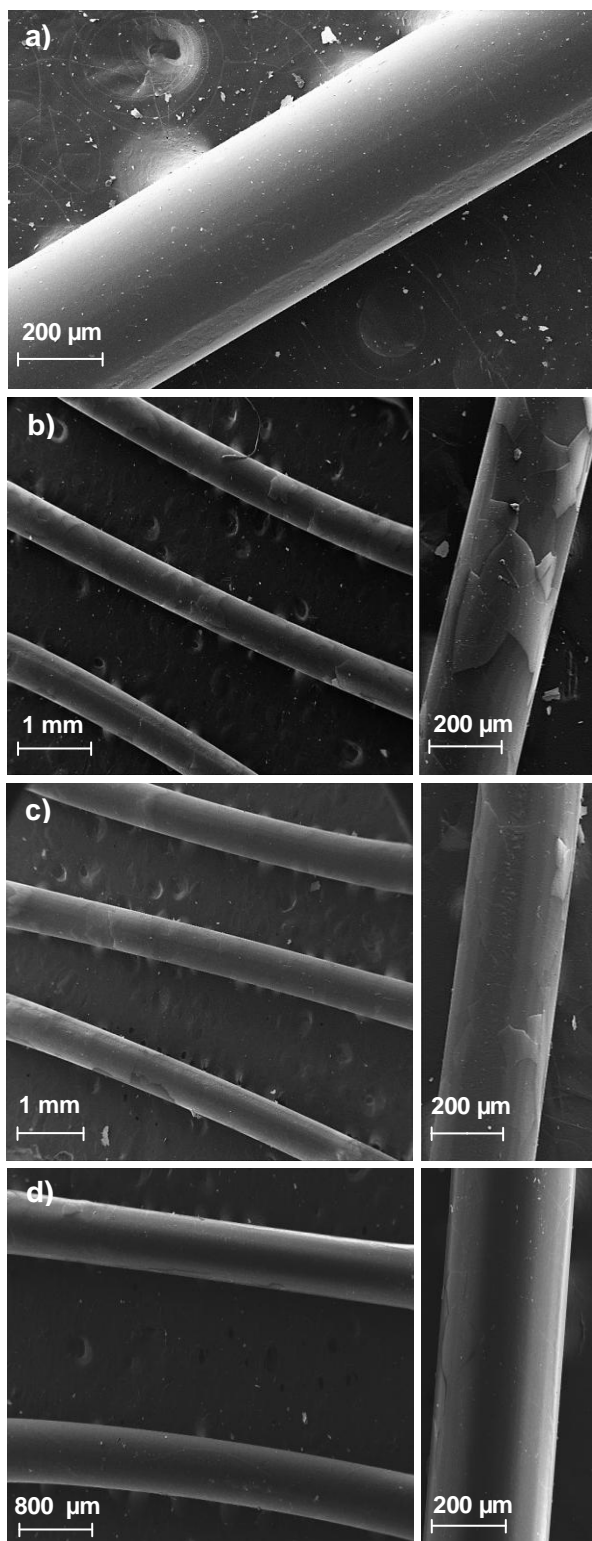


Figura 6.1.5. a) Sutura Monosyn[®] original, b) Sutura Monosyn[®] recoberta en un bany al 3% de copolímer LA-co-TMC 35:65 durant 2 minuts i assecada en estufa a 37 °C, c) Sutura Monosyn[®] recoberta en un bany al 3% de copolímer LA-co-TMC 35:65 durant 2 minuts i assecada en estufa a 120 °C i d) Sutura Monosyn[®] recoberta en un bany al 3% de copolímer LA-co-TMC 35:65 durant 2 minuts i assecada amb un bufador d'aire calent.

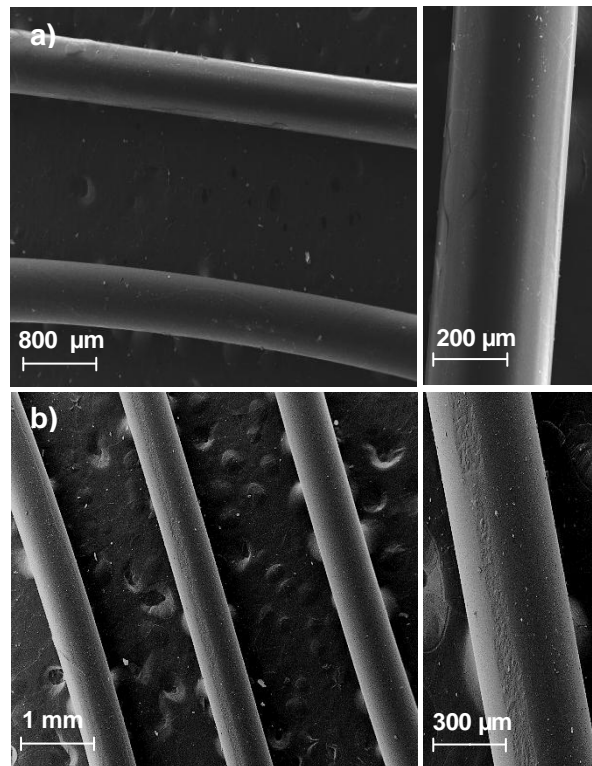


Figura 6.1.6. a) Sutura Monosyn[®] recoberta en un bany al 3% de copolímer LA-co-TMC 35:65 durant 2 minuts i assecada amb un bufador d'aire calent i b) Sutura Monosyn[®] recoberta en un bany al 3% de copolímer LA-co-TMC 35:65 durant 5 segons i assecada amb un bufador d'aire calent.

Un altre paràmetre que s'ha optimitzat ha estat la concentració de recobriment en el bany. Es van preparar dos concentracions més a part de la de 3% (1% i 10% *p/v*). En el cas del bany més concentrat, s'adverteix un cúmul de recobriment sobre la superfície del fil, i aquesta no queda totalment homogènia (*Figura 6.1.7. b*). La superfície dels fils recoberts en el bany al 1% presenta homogeneïtat (*Figura 6.1.7. a*), però no s'acaba de veure si la quantitat total dipositada de recobriment és suficient per a que influeixi significativament als estudis que s'han de realitzar posteriorment.

Valorant els diferents factors d'optimització, i tenint com a referència altres treballs realitzats en el grup PSEP, els quals obtenien bons resultats amb banys de recobriment concentrat al 3%, es va decidir recobrir la sutura en un bany al 3% de LA-co-TMC 35:65, durant 5 segons i assecant, immediatament després de la immersió, amb un bufador d'aire calent uns 10-15 segons. Amb aquests factors, s'obté una pel·lícula fina i homogènia sobre la superfície dels fils de sutura (*Figura 6.1.6. b*).

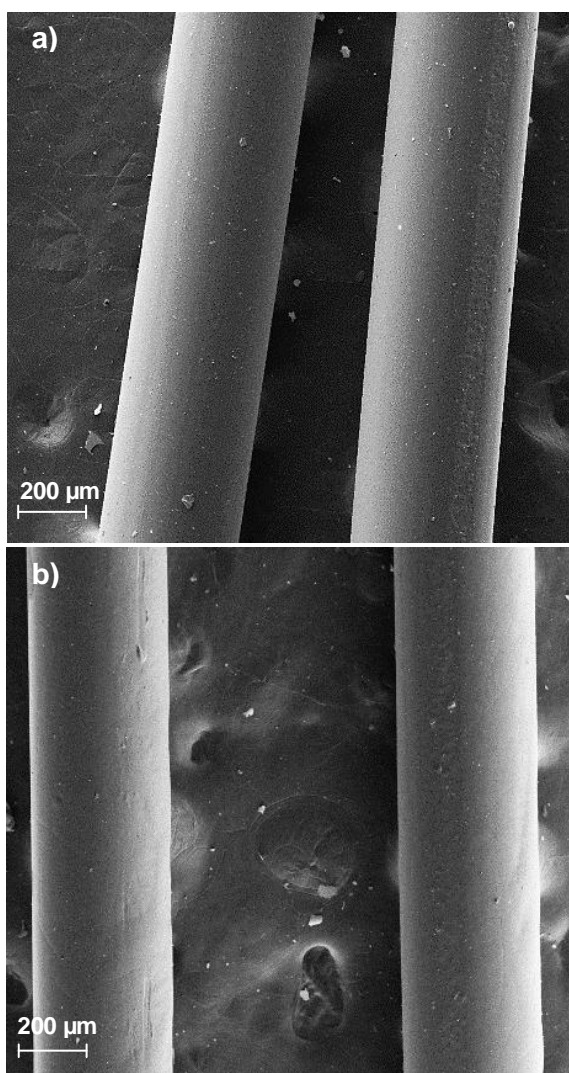


Figura 6.1.7. a) Sutura Monosyn[®] recoberta en un bany al 1% de copolímer LA-co-TMC 35:65 durant 5 segons i assecada amb un bufador d'aire calent i b) Sutura Monosyn[®] recoberta en un bany al 10% de copolímer LA-co-TMC 35:65 durant 5 segons i assecada amb un bufador d'aire calent.

6.2. Incorporació de CHX en fils de sutura

GL-*b*-[GL-co-TMC-co-CL]-*b*-GL

En el desenvolupament de tot l'estudi s'han utilitzat fils de sutura constituïts de GL (72 wt%), TMC (14 wt%) i CL (14 wt%) (Monosyn® color violeta de calibre USP 0). El material va ser subministrat per *B. Braun Surgical S.A.* i compleix la *European Pharmacopoeia* (01/2005:0666).

La càrrega de clorhexidina per adsorció sobre els fils de sutura, així com l'experiència de dipositar posteriorment un recobriment, es va dur a terme mitjançant el procediment descrit en l'apartat 5.2.2.

La quantitat carregada i alliberada de clorhexidina en els fils de sutura s'ha determinat per espectroscòpia UV-Vis, en un rang de longitud d'ona entre 200 nm i 350 nm. Abans però, s'han realitzat tres corbes de calibrat: dos per als corresponents medis d'alliberació (EtOH i PBS-EtOH 30:70 v/v) i una per a la barreja HFIP-EtOH 50:50 v/v.

El fàrmac presenta una absorbància màxima en una longitud d'ona concreta per a cada medi, sent de 259 nm, 261 nm i 257 nm per a l'EtOH, PBS-EtOH 30:70 v/v i HFIP-EtOH 50:50 v/v respectivament.

En la *Figura 6.2.1.* es mostren els espectres d'absorció en cada medi, així com les corbes de calibrat corresponents. El valor de la pendent de les corbes ens dona la relació existent entre absorbància i els µg/mL de clorhexidina.

Les variacions de pendent que s'observen són el resultat del canvi en les transicions electròniques de la clorhexidina com a conseqüència de l'entorn, és a dir, del dissolvent en que es troben. Es destaca la bona linealitat aconseguida en els tres medis. La solubilitat de clorhexidina és millor en la dissolució d'EtOH i PBS-EtOH 30:70 v/v, ja que es poden quantificar concentracions fins a 25 µg/mL, i menor en HFIP-EtOH 50:50 v/v.

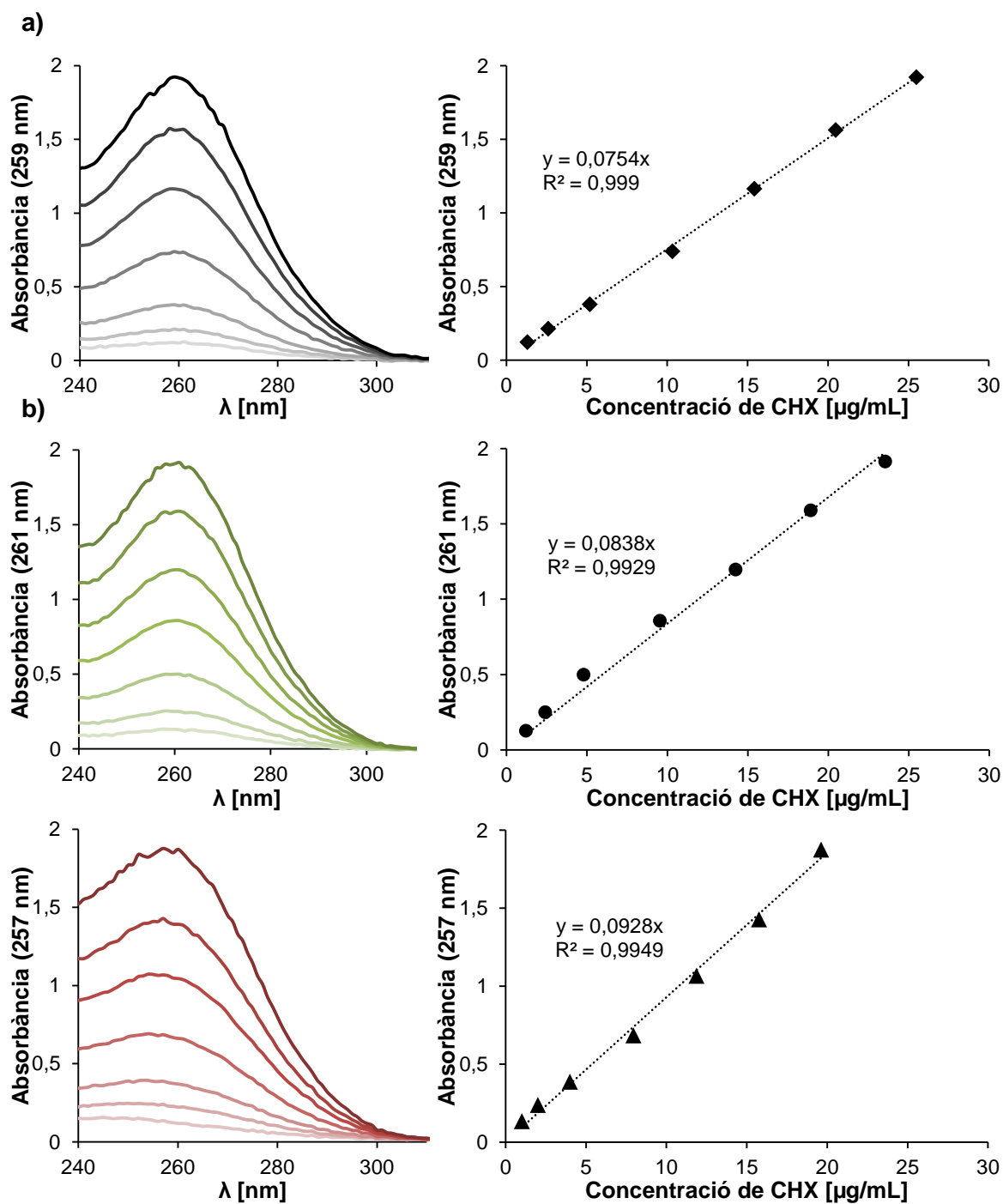


Figura 6.2.1. Corbes de calibrat de la CHX en a) EtOH, b) PBS-EtOH 30:70 v/v i c) HFIP-EtOH 50:50 v/v.

6.2.1. Determinació de la quantitat total de CHX carregada

Per a determinar la quantitat inicial de clorhexidina incorporada en els fils de sutura (*Figura 6.2.2.*), aquests, després de ser submergits en banys de diferents concentracions de fàrmac i haver estat recoberts o no pel copolímer de recobriment, es van dissoldre en una barreja d'HFIP-EtOH 50:50 v/v. Els assajos es van realitzar per triplicat i seguint el procediment descrit a l'apartat 5.5.1.

S'observen mínimes diferències en la càrrega segons el mètode emprat, encara que existeix la tendència a una càrrega superior en els fils de sutura posteriorment recoberts de LA-co-TMC 35:65 3%; això potser reflexa una major estabilitat del fàrmac una vegada es cobert respecte a posteriors manipulacions. És interessant el fet que la clorhexidina no s'allibera en absolut quan es fa passar el fil de sutura pel bany de recobriment. En ambdós casos, adsorció i adsorció amb posterior recobriment, la proporció de clorhexidina en els fils de sutura augmenta a l'incrementar la concentració d'aquesta en el bany, i la diferència de quantitat entre mètodes es fa més notòria en les concentracions del bany de 5% i 10%.

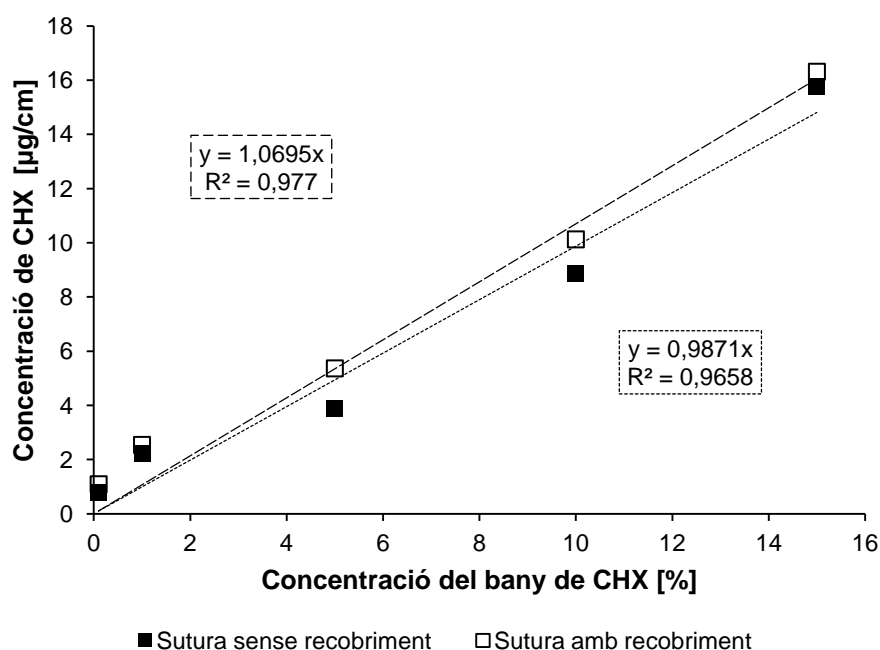


Figura 6.2.2. Quantitat inicial de CHX carregada en els fils de sutura en funció de la concentració del bany de CHX (0,1%; 1%; 5%; 10% i 15%) i de si s'ha recobert o no amb LA-co-TMC 35:65 3%.

La quantitat de clorhexidina dipositada en la sutura va oscil·lar entre 0,80 i 15,75 µg/cm en el mètode d'adsorció de fàrmac únicament, i entre 1,10 i 16,31 µg/cm per adsorció de fàrmac i posterior addició del recobriment. Aquestes dades indiquen que la càrrega per adsorció es manté durant el procés de recobriment. Els estudis existents indiquen que, concentracions de clorhexidina de 10 µg/mL no afecten la viabilitat cel·lular de fibroblasts dèrmics

humans^[72], així doncs, la possible dosi que rebria un pacient en cas de ser suturat amb un fil amb concentracions dins del rang citat, no hauria de provocar problemes de toxicitat greu, sempre i quan la concentració de fàrmac sigui igual o inferior al que s'incorpora en el bany del 10%.

6.2.2. Alliberació de CHX

L'estudi de l'alliberació de clorhexidina en cada medi es va realitzar en les condicions més adients per tal de recrear-la, dins de les possibilitats, de forma anàloga a com ho faria en un individu. Tenint en compte que les primeres hores després d'una intervenció són les més crítiques, respecte a la possibilitat de desenvolupar infeccions, s'ha representat gràficament el percentatge de fàrmac alliberat en funció del temps, fins a 8 hores des de l'inici de l'alliberació (*Figura 6.2.3.*), tot i que l'assaig es va prolongar 6 dies. A partir d'aquestes primeres 8 hores les corbes d'alliberació es mantenen constants, és a dir, la concentració de fàrmac arriba a l'equilibri amb els medis.

La quantitat de clorhexidina alliberada en els dos medis i mètodes, va arribar a un valor asimptòtic inferior a la quantitat total de fàrmac incorporat. En molts casos però, aquest valor va ser superior al 90% del carregat inicialment. S'observa com la quantitat màxima de fàrmac alliberat creix al augmentar la concentració d'aquest en el bany, menys en el cas de l'alliberació en medi PBS-EtOH 30:70 v/v sense recobrir (*Figura 6.2.3. c)*), on els fils carregats en el bany de 5% de clorhexidina va alliberar més que els carregats en el de 10%, tot i que els valors són molt similars.

L'elevada solubilitat del fàrmac amb els medis, determina doncs, una ràpida alliberació de l'ordre d'un 75% de la quantitat inicialment incorporada, entre els 30-300 minuts de l'inici dels assajos, en fils carregats en banys de concentracions altes. Aquest fet pot ser d'interès en la situació que ens ocupa: aconseguir una dosi ràpida de fàrmac en les primeres hores postoperatòries, afectant directament a la proliferació de bacteris.

Si s'analitza l'alliberació total de clorhexidina en cada medi segons els dos mètodes de treball, s'arriba a la conclusió de que els fils de sutura posteriorment recoberts amb LA-co-TMC 35:65 3%, són propensos a alliberar més quantitat de clorhexidina (*Figura 6.2.4. a) i b)*).

Comparant els medis d'alliberació, la tendència indica que s'allibera més fàrmac sense recobriment posterior en medi EtOH, a excepció de quan s'incorpora CHX en fils de sutura en els banys de 5% i 15%, on els valors són molt similars (*Figura 6.2.4. c)*). Quan a la sutura se li afegeix el recobriment, el comportament no varia significativament; en medi EtOH s'aconsegueix, en general, més quantitat total alliberada de fàrmac, malgrat que els valors són molt similars (*Figura 6.2.4. d)*).

Els resultats d'alliberació semblen indicar que una part del fàrmac queda eficaçment adsorbit sobre el material de sutura i per exemple no es produeix una desadsorció apreciable quan la càrrega de fàrmac es reduïda. La presència de recobriment no dóna lloc a un retard apreciable en l'alliberació del fàrmac i inclús pot afavorir el procés si el material s'infla per acció del solvent o es desprèn de la sutura.

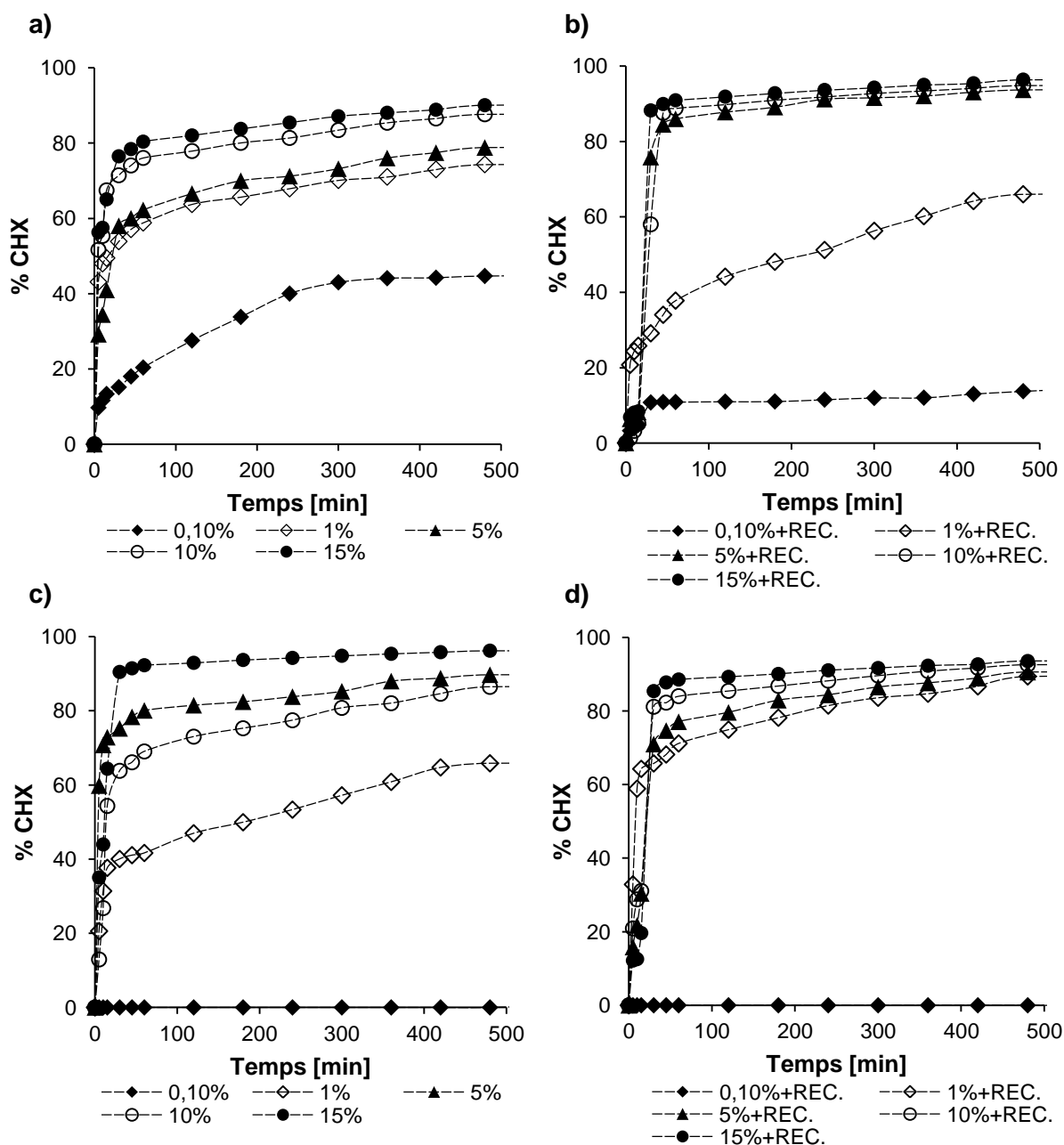


Figura 6.2.3. Alliberació de CHX a) en medi EtOH sense recobrir, b) en medi EtOH recobrint, c) en medi PBS-EtOH 30:70 v/v sense recobrir i d) en medi PBS-EtOH 30:70 v/v recobrint.

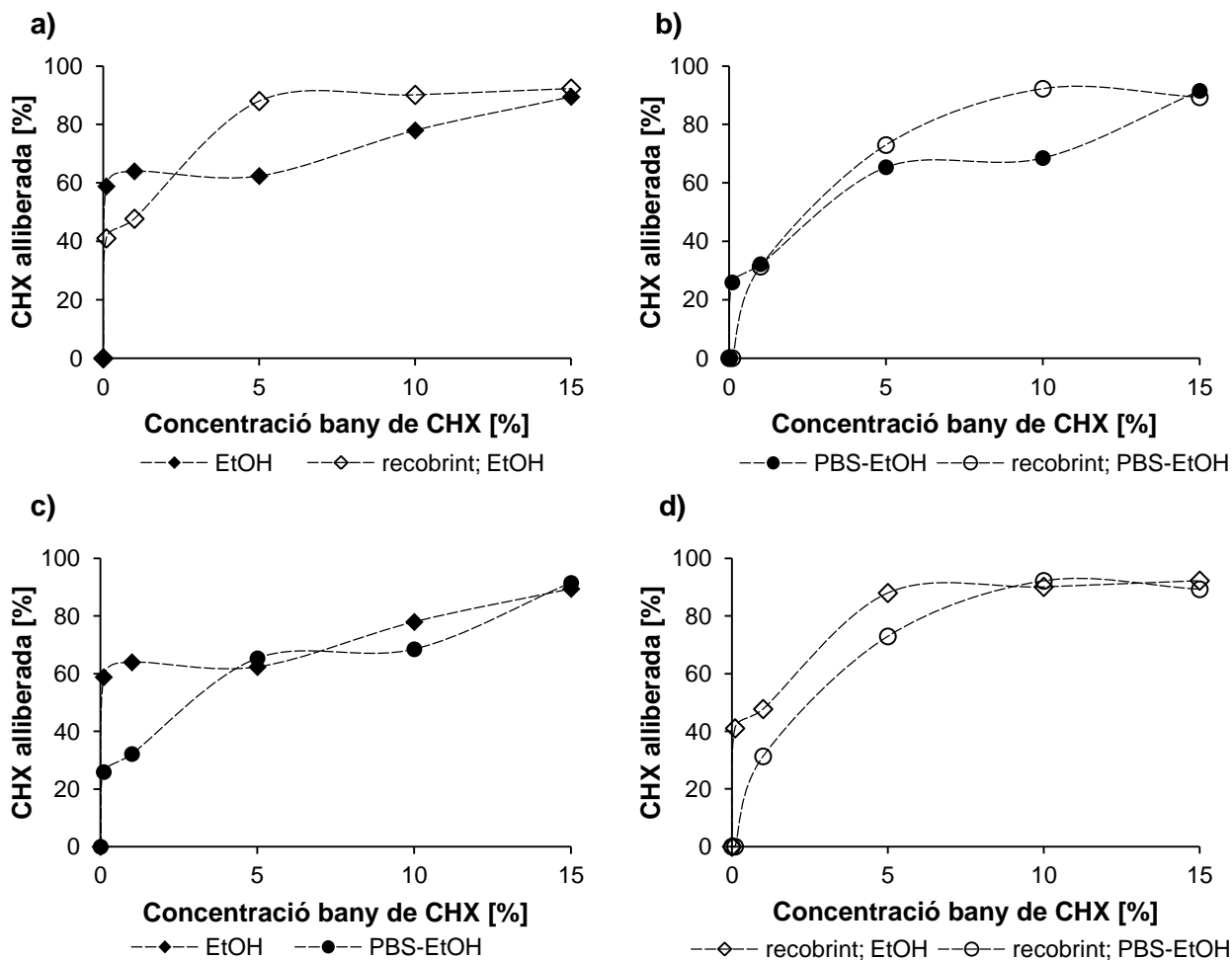


Figura 6.2.4. Quantitat total de CHX alliberada en % segons la concentració en el bany: a) en medi EtOH sense i amb recobrint, b) en medi PBS-EtOH 30:70 v/v sense i amb recobrint, c) sense recobrint en medis EtOH i PBS-EtOH 30:70 v/v i d) amb recobrint en medis EtOH i PBS-EtOH 30:70 v/v.

Les imatges obtingudes mitjançant SEM, rebel·len que la morfologia dels fils de sutura no es veu afectada significativament després del procés d'alliberació (Figures 6.2.5. i 6.2.6.). Tan sols es discerneix com part del copolímer de recobrint s'ha inflat. El medi d'alliberació s'ha difós entre els fils de sutura i el recobrint, formant bombolles. En l'alliberació en PBS-EtOH 30:70 v/v, s'entreveuen cristalls de PBS que han precipitat. Tot apunta, doncs, que la sutura no pateix canvis rellevants pel que fa a integritat física, mantenint les seves propietats mecàniques en els primers dies de l'alliberació del fàrmac.

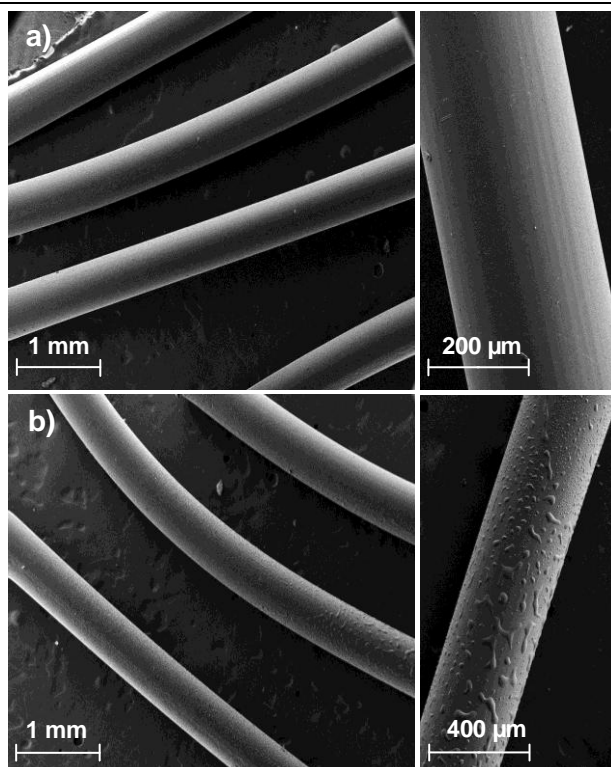


Figura 6.2.5. Morfologia dels fils de sutura un cop realitzada l'alliberació de CHX en medi EtOH
 a) fil de sutura carregat en un bany del 5% de CHX i b) fil de sutura carregat en un bany del 5% de CHX i posteriorment recobert amb LA-co-TMC 35:65 3%.

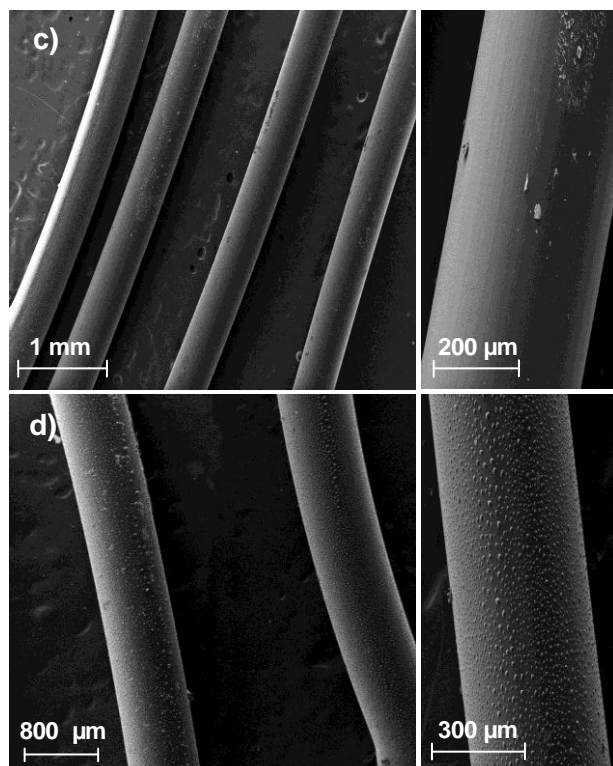


Figura 6.2.6. Morfologia dels fils de sutura un cop realitzada l'alliberació de CHX en medi PBS-EtOH 30:70 v/v c) fil de sutura carregat en un bany del 5% de CHX i d) fil de sutura carregat en un bany del 5% de CHX i posteriorment recobert amb LA-co-TMC 35:65 3%.

6.3. Incorporació de captopril en fils de sutura

GL-*b*-[GL-co-TMC-co-CL]-*b*-GL

La càrrega de captopril per adsorció sobre els fils de sutura, així com l'experiència d'afegir posteriorment un recobriment, es va dur a terme mitjançant el procediment descrit en l'apartat 5.2.2. Aquest compost s'ha estudiat per a que inhibeixi l'enzim convertidor d'angiotensina afavorint la vasodilatació en els teixits perifèrics, donant una major irrigació i fent possible que una ferida es pugui cicatritzar més ràpidament.

Per tal de determinar la quantitat incorporada i alliberada de captopril, en la *Figura 6.3.1.* es mostren les corbes de calibrat corresponents als dos medis d'alliberació i per a la barreja HFIP-EtOH 50:50 v/v.

El fàrmac presenta una absorbància màxima en una longitud d'ona determinada per a cada medi, sent de 204 nm, 202 nm i 200 nm per a l'EtOH, PBS-EtOH 30:70 v/v i HFIP-EtOH 50:50 v/v respectivament. A més, en EtOH i en la mescla HFIP-EtOH 50:50 v/v, el captopril presenta coeficients d'extinció molar (ϵ) baixos, a diferència del que passa en PBS-EtOH 30:70 v/v. La part cromofòrica de la molècula requereix un entorn salí per a la seva excitació, és a dir, per a que canvis transicionals en els nivells d'energia electrònica i vibracional de la molècula puguin ocórrer. La presència d'EtOH o HFIP-EtOH 50:50 v/v afavoreix l'estat fonamental del captopril, i com a conseqüència, en elevades concentracions de captopril, el ϵ deixa de ser funció de la concentració de la molècula, observant-se un desviació negativa de la llei de Lambert-Beer. Això és degut a canvis estructurals d'agregació.

Finalment, els resultats indiquen que la espectroscòpia d'absorció UV-Vis com a mètode de quantificació pot ser aplicat per a la determinació de captopril en els diferents medis d'alliberació com són EtOH i PBS-EtOH 30:70 v/v, i per a la barreja HFIP-EtOH 50:50 v/v.

S'ha descrit que la quantificació de captopril mitjançant espectroscòpia UV-Vis pot tenir associada alguns problemes, ja que és susceptible a la degradació oxidativa, especialment en dissolucions aquoses, on els grups tiols, per un mecanisme radicalari, formen enllaços disulfurs durant la degradació^[73]. El procés d'oxidació es pot retardar ajustant el pH a valors àcids, addicionant agents quelats, incrementant la concentració de captopril, treballant en una atmosfera inert de nitrogen i/o incorporant antioxidants^[74]. Per tant, les alternatives plantejades per a la quantificació del captopril per espectroscòpia es basen en una determinació indirecta, formant complexos, reaccions d'acoblament i/o reaccions redox per reduir l'efecte del captopril^[75]. En aquest sentit, els resultats obtinguts per al captopril es revisaran en treballs futurs amb l'aplicació d'una metodologia diferent a la espectroscòpia UV-Vis.

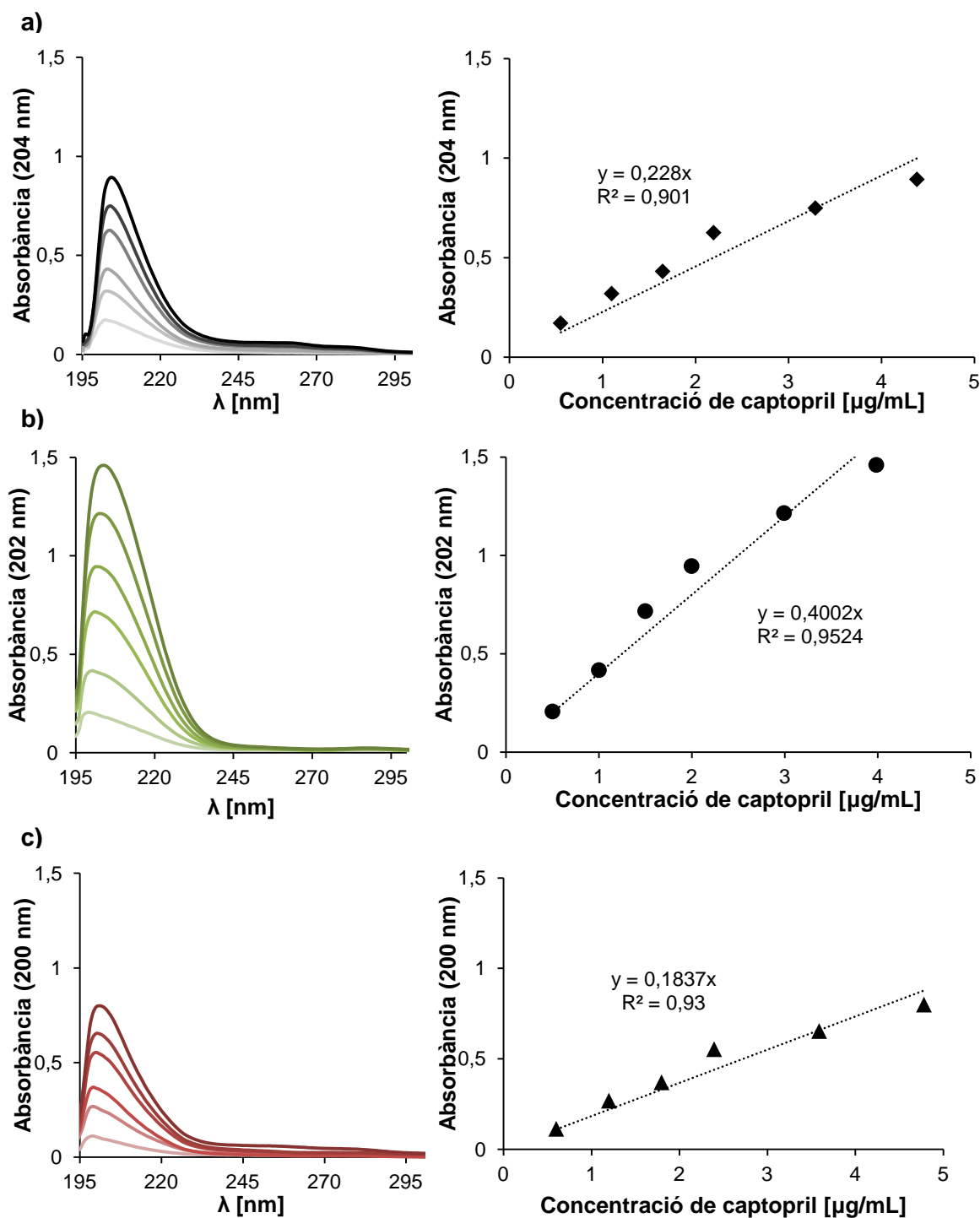


Figura 6.3.1. Corbes de calibrat del captopril en a) EtOH, b) PBS-EtOH 30:70 v/v i c) HFIP-EtOH 50:50 v/v.

6.3.1. Determinació de la quantitat total de captopril carregat

La quantitat inicial de captopril incorporada en els fils de sutura es representa en la *Figura 6.3.2*. En el cas del captopril, s'incorpora més quantitat de fàrmac en els fils sense recobriments. La proporció de captopril en els fils de sutura augmenta al concentrar el bany de càrrega, i la diferència de quantitat incorporada entre els fils sense i amb recobriments, augmenta a l'incrementar la concentració de captopril en el bany.

La quantitat de captopril dipositada en la sutura va fluctuar entre 0,47 i 8,06 µg/cm en el mètode d'adsorció de fàrmac únicament, i entre 0,27 i 4,59 µg/cm en el segon mètode (adsorció de fàrmac amb posterior addició del recobriments). Això indicaria que un procés important de desadsorció (al voltant d'un 50% de la càrrega adsorbida) succeeix en el bany de recobriments.

Els valors obtinguts no haurien de produir cap mena de toxicitat, la dosi diària de captopril per a pacients hipertensius, d'insuficiència cardíaca, etc. es mou en un rang de mg/dia.

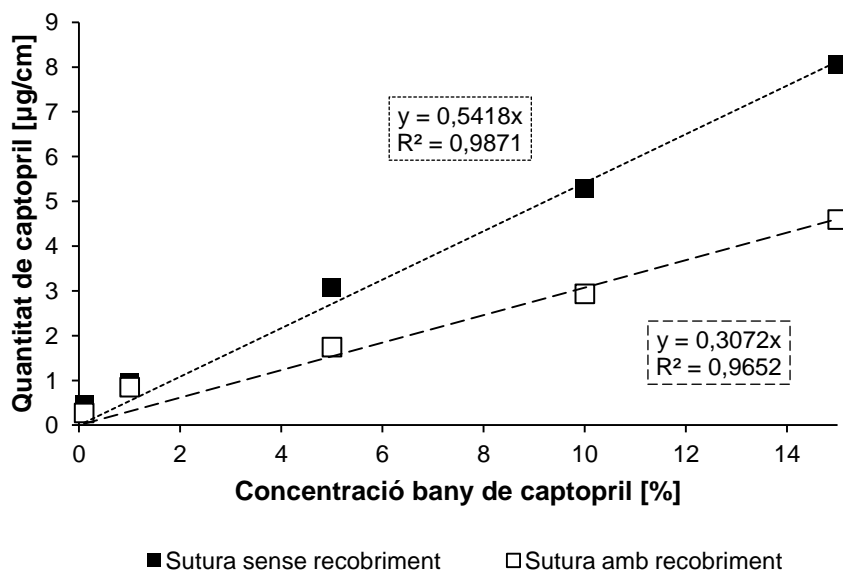


Figura 6.3.2. Quantitat inicial de captopril carregat en els fils de sutura en funció de la concentració del bany de captopril (0,1%; 1%; 5%; 10% i 15%) i de si s'ha recobert o no amb LA-co-TMC 35:65 3%.

6.3.2. Alliberació de captopril

L'estudi de l'alliberació de captopril es va realitzar en dos medis de diferents hidrofobicitat, EtOH i PBS-EtOH 30:70 v/v, a 37 °C i en contínua agitació. Una ferida pot trigar dies i/o setmanes en cicatritzar de manera que, si el mal és gran, el procés pot ser susceptible de ser suspès. Per a que el procés de cicatrització pugui ser reforçat, el més interessant seria obtenir una cinètica d'alliberació de captopril perllongada.

A la *Figura 6.3.3.* es representa el percentatge de fàrmac alliberat en funció del temps, fins als 3 dies des del inici de l'assaig, de les mostres carregades en els banys de captopril al 0,1% i 15%. La quantitat de captopril alliberat en els dos medis i mètodes, va arribar a un valor inferior a la quantitat total de fàrmac incorporat. Només en l'alliberació en medi EtOH amb fils sense recobrir, s'arriba a uns valors al voltant del 50% per a les mostres submergides en el bany de 0,1% de captopril.

S'observa una alliberació ràpida i en creixement durant les primeres 8 hores en les mostres sense recobrir en contacte amb medi EtOH (*Figura 6.3.3. a)*), i a partir del primer dia d'assaig la velocitat d'alliberació s'atenua fins al final de l'experiència. Pel que fa a les mostres amb recobriment, el comportament és similar, amb la diferència que la velocitat d'alliberació es torna constant a partir de les 53 hores d'haver iniciat l'experiment (*Figura 6.3.3. b)*). En el medi més hidrofílic, PBS-EtOH 30:70 v/v, les mostres carregades amb captopril (*Figura 6.3.3. c)*), en general, presenten una alliberació ràpida durant les 8 primeres hores, i a partir de les 24 hores, s'arriba a l'equilibri amb el medi; mentre que les mostres carregades i recobertes pel copolímer de recobriment (*Figura 6.3.3. d)*), segueixen una alliberació contínua de creixement. Solament presenten una ràpida alliberació en les 2 primeres hores.

En conjunt, sembla ser que les mostres menys carregades alliberin més quantitat de captopril, això es degut a que es necessita més quantitat de fàrmac per arribar a l'equilibri amb els medis.

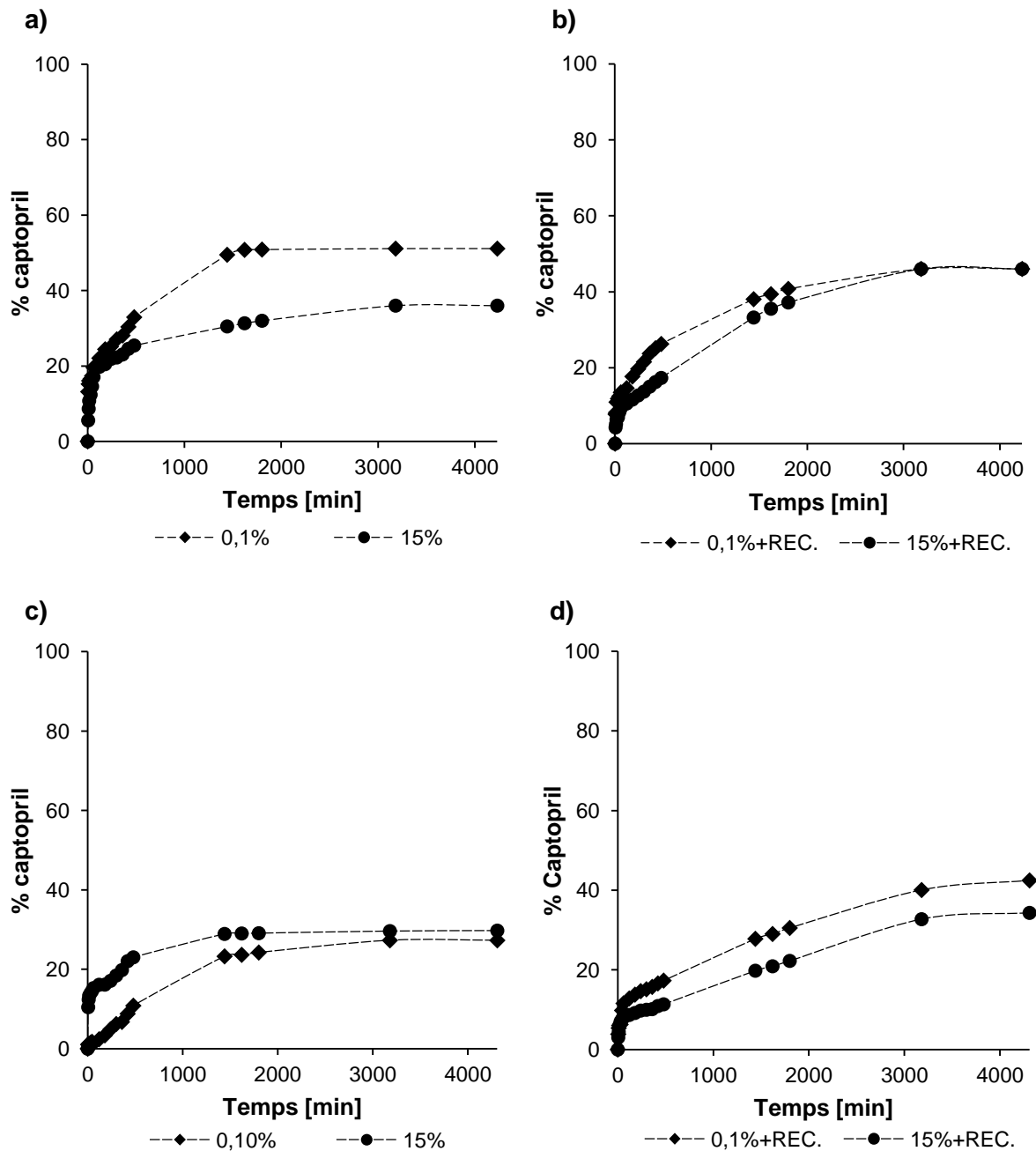


Figura 6.3.3. Alliberació de captopril a) en medi EtOH sense recobrir, b) en medi EtOH recobrint, c) en medi PBS-EtOH 30:70 v/v sense recobrir i d) en medi PBS-EtOH 30:70 v/v recobrint.

Analitzant l'alliberació total de captopril en cada medi de les mostres carregades en els diferents banys de fàrmac, i segons els dos mètodes estudiats, s'arriba al concent de què els fils de sutura posteriorment recoberts amb LA-co-TMC 35:65 3%, són propensos a alliberar una mica més quantitat de captopril, a excepció de les mostres carregades en banys del 0,1%, 1% i 5%, i en medi d'alliberació EtOH (Figura 6.3.4. a) i b)).

Si es comparen els dos medis, en les mostres sense recobrir s'allibera més quantitat de fàrmac en medi EtOH (*Figura 6.3.4. c*). Al afegir el copolímer de recobriment, el comportament és idèntic, s'obté més quantitat alliberada en medi EtOH (*Figura 6.3.4. d*).

Dins d'aquest estudi, no es veuen diferències significatives respecte a l'alliberació total de fàrmac segons el medi d'alliberació i el mètode emprat. En EtOH i dins de tot el rang de concentracions estudiades del bany de captopril, s'arriba a alliberar al voltant d'un 40%; mentre que en medi PBS-EtOH 30:70 v/v un 30%.

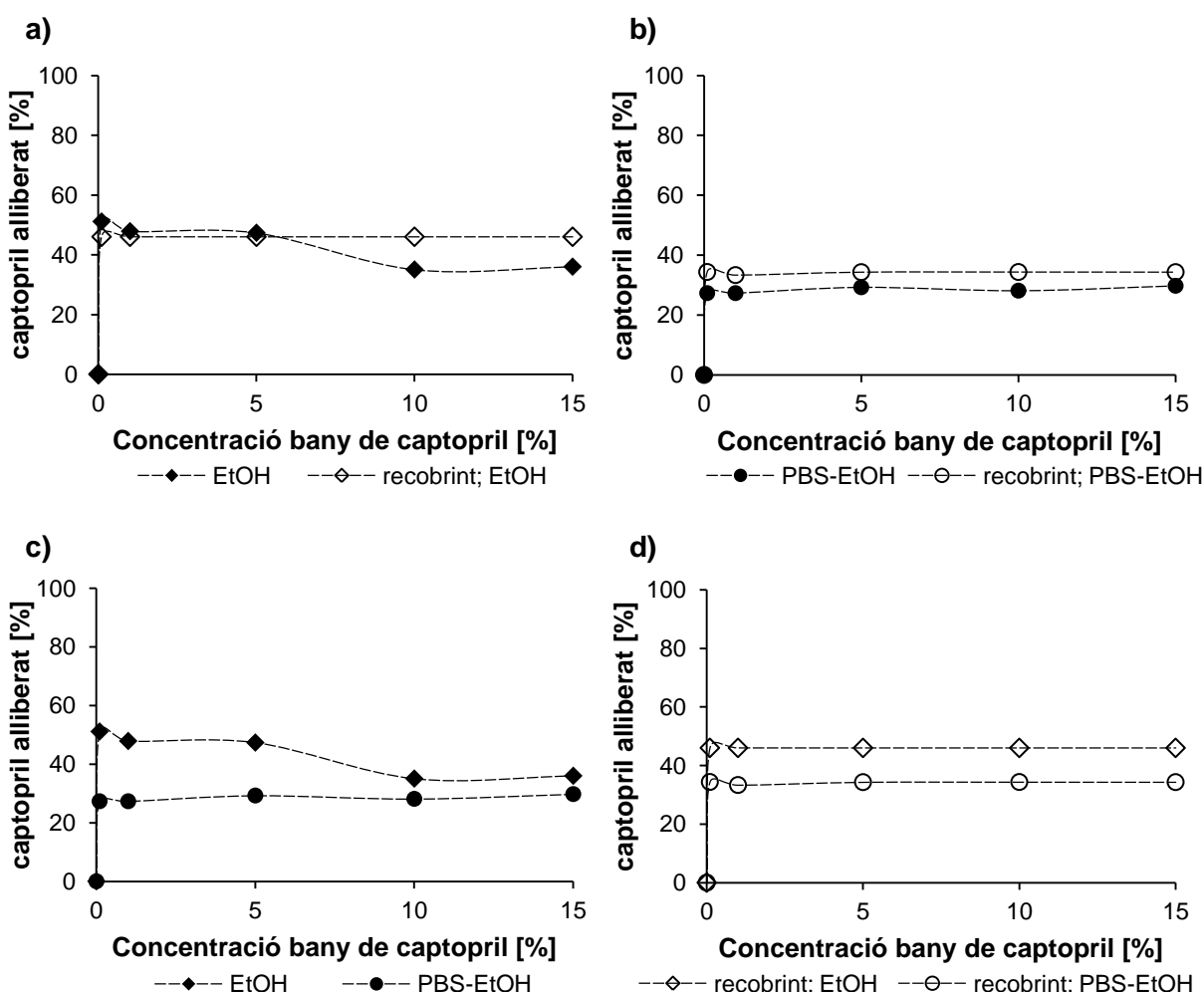


Figura 6.3.4. Quantitat total de captopril alliberat en % segons la concentració en el bany: a) en medi EtOH sense i amb recobriment, b) en medi PBS-EtOH 30:70 v/v sense i amb recobriment, c) sense recobriment en medis EtOH i PBS-EtOH 30:70 v/v i d) amb recobriment en medis EtOH i PBS-EtOH 30:70 v/v.

A les *Figures 6.3.5. i 6.3.6.* es poden veure les imatges obtingudes mitjançant SEM dels fils de sutura després del procés d'alliberació. La seva morfologia no pateix cap canvi destacable, únicament en les mostres recobertes es veu l'efecte de difusió dels medis d'alliberació entre els fils i el copolímer de recobriment. La sutura preserva la seva integritat física.

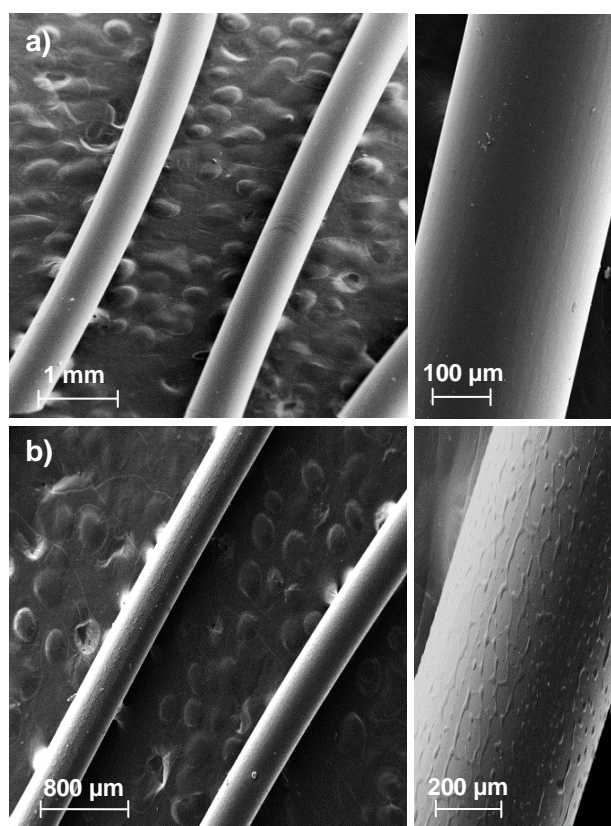


Figura 6.3.5. Morfologia dels fils de sutura un cop realitzada l'alliberació de captopril en medi EtOH a) fil de sutura carregat en un bany del 5% de captopril i b) fil de sutura carregat en un bany del 5% de captopril i posteriorment recobert amb LA-co-TMC 35:65 3%.

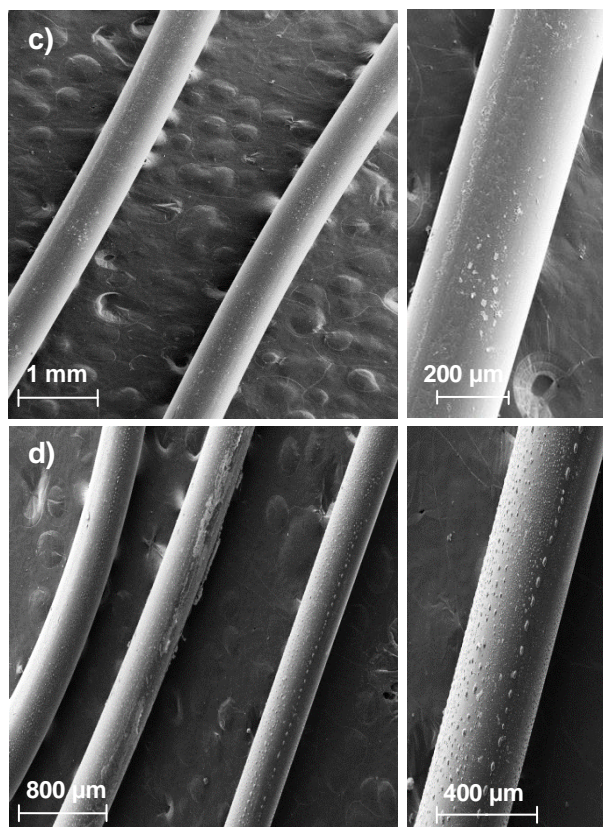


Figura 6.3.6. Morfologia dels fils de sutura un cop realitzada l'alliberació de captopril en medi PBS-EtOH 30:70 v/v c) fil de sutura carregat en un bany del 5% de captopril i d) fil de sutura carregat en un bany del 5% de captopril i posteriorment recobert amb LA-co-TMC 35:65 3%.

6.4. Assajos biològics

6.4.1. Activitat antibacteriana dels fils de sutura amb CHX

6.4.1.1. Inhibició del creixement bacterià

La capacitat d'inhibició del creixement bacterià dels fils de sutura carregats amb clorhexidina, es va avaluar quantitativament i qualitativament, mitjançant les corbes de creixement bacterià i les plaques d'agar respectivament. Les Figures 6.4.1., 6.4.2., 6.4.3 i 6.4.4. mostren les corbes de creixement relatiu de les bactèries *E. coli* i *M. luteus* en presència de fils de sutura carregats en els banys de diferent concentració de fàrmac, tenint en compte els dos mètodes estudiats. En elles, es poden diferenciar les etapes típiques del creixement bacterià, sobretot les de latència i de creixement exponencial. En general, totes les mostres han originat un retard en el temps de creixement bacterià i la proliferació d'un nombre inferior de bactèries respecte al control i al blanc (sutura sense clorhexidina). La clorhexidina alliberada al medi des del fil de sutura dificulta l'adaptació dels bacteris i el seu creixement.

Els fils carregats en el bany de fàrmac menys concentrat, presenta una corba de creixement de bacteris *E. coli* similar a la del control; la concentració dipositada doncs, no és suficient per inhibir la proliferació bacteriana. Respecte als fils de sutura immersos en el bany concentrat al 1%, la fase de latència s'allarga fins a les 8 hores des de l'inici de l'assaig en els dos casos (amb i sense recobriment), i presenta menys creixement de població en els fils posteriorment recoberts. En els altres casos, el creixement és pràcticament inapreciable les primeres 24 hores, i a les 48h sempre és inferior en els fils posteriorment recoberts. Així doncs, la càrrega de clorhexidina en el bany del 1% representa una dosi amb activitat bacteriostàtica, i les càrregues en banys superiors al 1% corresponen a una dosi amb activitat biocida.

En el cas dels bacteris *M. luteus*, els fils carregats en banys de 0,1% i 1% de clorhexidina, presenten unes corbes amb un comportament anàleg a les dels bacteris *E. coli*; no passa el mateix però, amb les mostres carregades en els banys de 5%, 10% i 15%: el creixement relatiu dels bacteris no arriba al 10% les primeres 24 hores, a excepció dels fils carregats en el bany concentrat al 5% que arriba a un 24,5% (Figura 6.4.3.). En general sembla que la clorhexidina és més eficaç contra bacteris *E. coli*, del tipus Gram-negatiu.

La inhibició del creixement bacterià és més efectiva quan els fils de sutura carregats amb fàrmac, són posteriorment recoberts amb LA-co-TMC 35:65 3%. Això concorda amb els resultats obtinguts en l'alliberació, ja que els fils tractats amb el recobriment, alliberen més quantitat de clorhexidina. La utilització de clorhexidina és eficaç per obtenir una acció inhibidora ràpida, i en alguns casos es pot perllongar fins als 2 dies d'activitat.

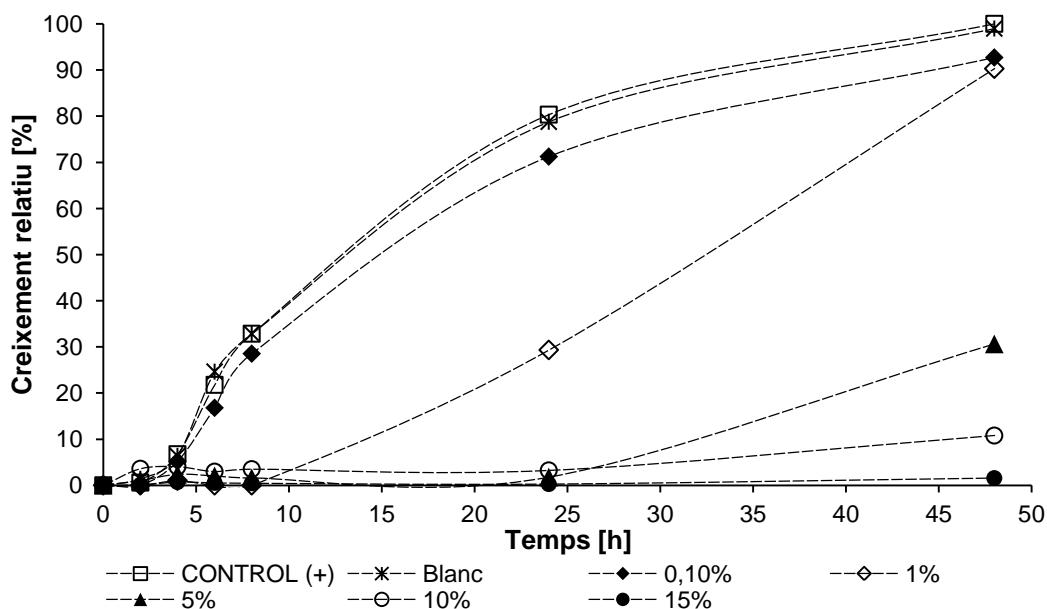


Figura 6.4.1. Proliferació de bactèries *E. coli* sobre fils de sutura carregats en banys de 0,1%; 1%; 5%; 10% i 15% de CHX.

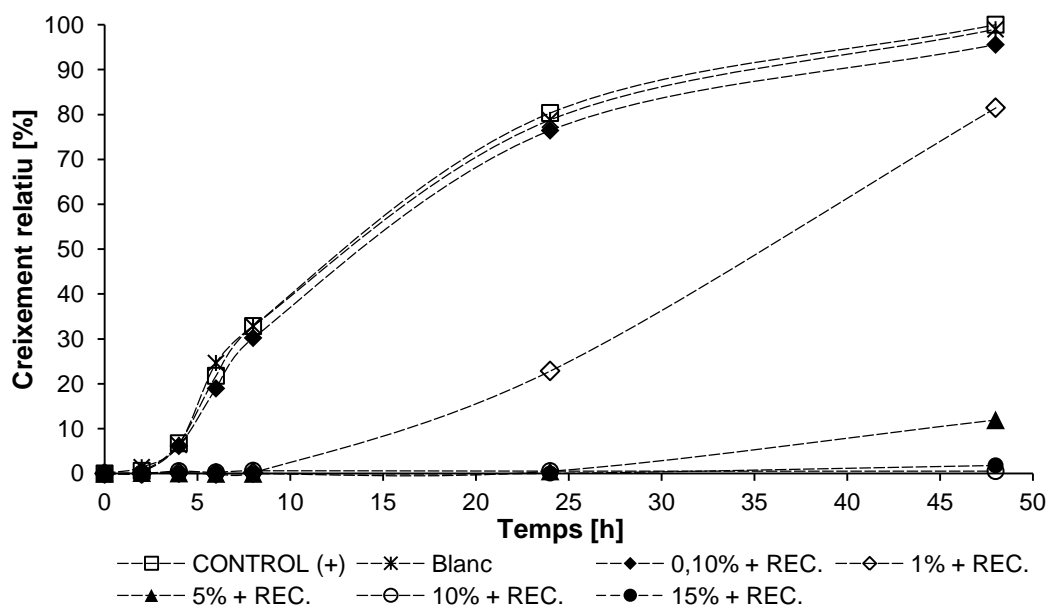


Figura 6.4.2. Proliferació de bacteries *E. coli* sobre fils de sutura carregats en banys de 0,1%; 1%; 5%; 10% i 15% de CHX, i posteriorment recoberts de LA-co-TMC 35:65 3%.

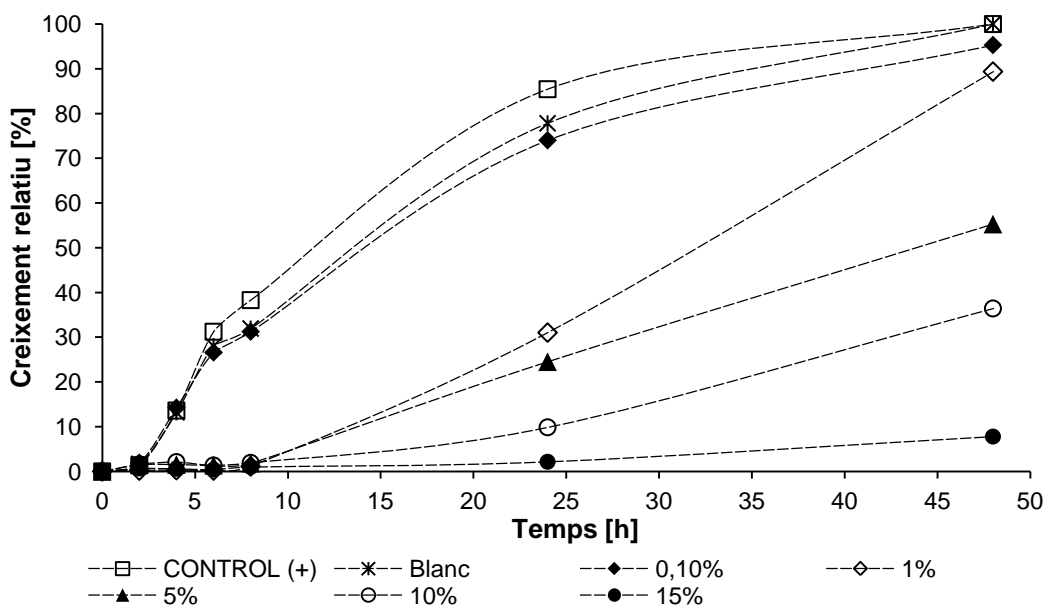


Figura 6.4.3. Proliferació de bacteries *M. luteus* sobre fils de sutura carregats en banys de 0,1%; 1%; 5%; 10% i 15% de CHX.

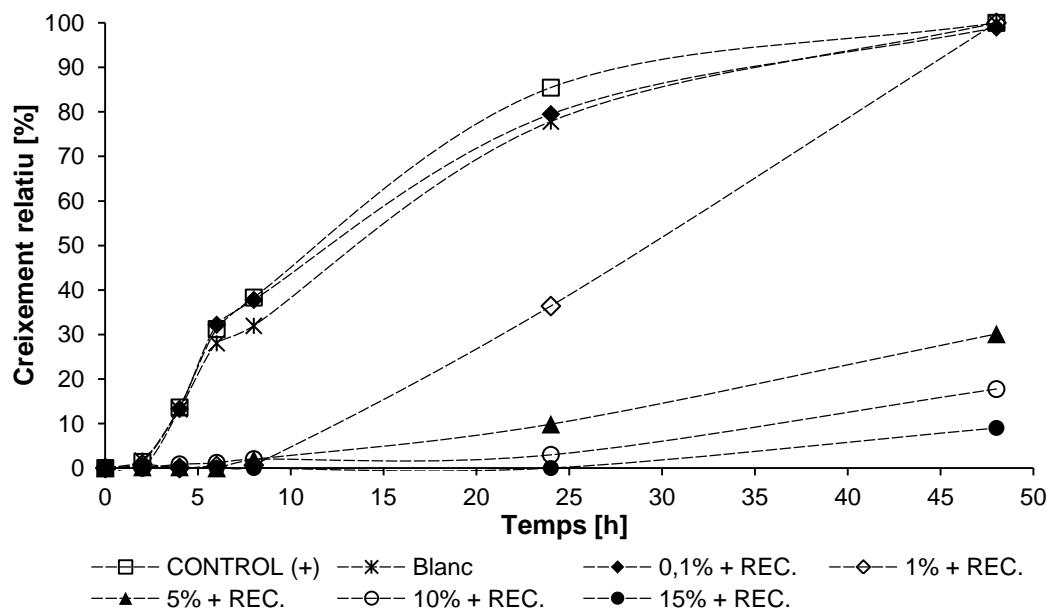


Figura 6.4.4. Proliferació de bacteris *M. luteus* sobre fils de sutura carregats en banys de 0,1%; 1%; 5%; 10% i 15% de CHX, i posteriorment recoberts de LA-co-TMC 35:65 3%.

En la següent taula es mostra de forma detallada la durada de la fase de latència i la velocitat de creixement (fase de creixement exponencial), dels diferents assajos per als dos bacteris:

Taula 6.4.1. Dades cinètiques dels bacteris *E. coli* i *M. luteus*: fase de latència i velocitat de creixement sobre fils de sutura carregats en banys de diferent concentració de CHX, (1) sense recobrir i (2) recobrint amb LA-co-TMC 35:65 3%.

	<i>E. coli</i>				<i>M. luteus</i>			
	Lag [h]		μ [h ⁻¹]		Lag [h]		μ [h ⁻¹]	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Control (+)	2,607	2,607	0,128	0,128	1,866	1,866	0,146	0,146
0%	2,628	2,628	0,183	0,183	1,907	1,907	0,165	0,165
0,10%	2,515	1,956	0,107	0,086	2,280	2,407	0,147	0,168
1%	8,569	8,177	0,032	0,038	5,747	6,705	0,014	0,038
5%	20,852	26,516	0,023	0,014	6,868	11,292	0,042	0,022
10%	28,291	37,350	0,023	0,004	9,988	14,496	0,012	0,057
15%	41,031	45,877	0,003	0,008	22,659	26,020	0,049	0,011

A grans trets, s'observa com la fase de latència es perllonga en augmentar la concentració de fàrmac en el bany de càrrega, i és major en els fils posteriorment recoberts, tant en les bacteris de tipus Gram-negatiu com positiu. La velocitat de creixement exponencial dels bacteris *E. coli*, en general, és més elevada en el fils de sutura únicament carregats de clorhexidina; mentre que la dels bacteris *M. luteus* aquest fet varia segons la concentració del bany de clorhexidina.

Els estudis d'inhibició del creixement bacterià també es van avaluar qualitativament, mitjançant plaques de cultiu agar (*Figures 6.4.5. i 6.4.6.*). L'alliberació del fàrmac es va produir en un medi semi-sòlid a 37 °C durant 24 hores. S'observa com, efectivament en les mostres més concentrades de clorhexidina, no es produeix proliferació bacteriana a sobre del fil de sutura.



Figura 6.4.5. Inhibició qualitativa dels bacteris *E. coli* en medi de cultiu VRBD AGAR. D'esquerra a dreta, mostres carregades en banys de CHX al 0,1%, 5% i 15%, i de dalt a baix, sense i amb recobriment.



Figura 6.4.6. Inhibició qualitativa dels bacteris *M. luteus* en medi de cultiu BGA. D'esquerra a dreta, mostres carregades en banys de CHX al 0,1%, 5% i 15%, i de dalt a baix, sense i amb recobriments.

6.4.1.2. Adhesió bacteriana

L'adhesió de microorganismes en els fils de sutura poden arribar a formar biofilms –una forma de resistència microbiana– fent que les bactèries siguin difícils d'eliminar. En la *Figura 6.4.7.* es mostren els resultats dels assajos d'adhesió dels bacteris *E. coli* i *M. luteus*. Ambdós bacteris, s'adhereixen molt bé als fils de sutura que han estat carregats en banys de 0,1% i 1% de clorhexidina, tant si porten o no recobriments. Existeix la tendència a una menor fixació de bacteris en els fils recoberts, tot i així, tant sols els que estan carregats en banys de 10% i 15% de clorhexidina amb incorporació posterior de recobriments, presenten una adhesió inferior al 50% respecte el Control i el blanc.

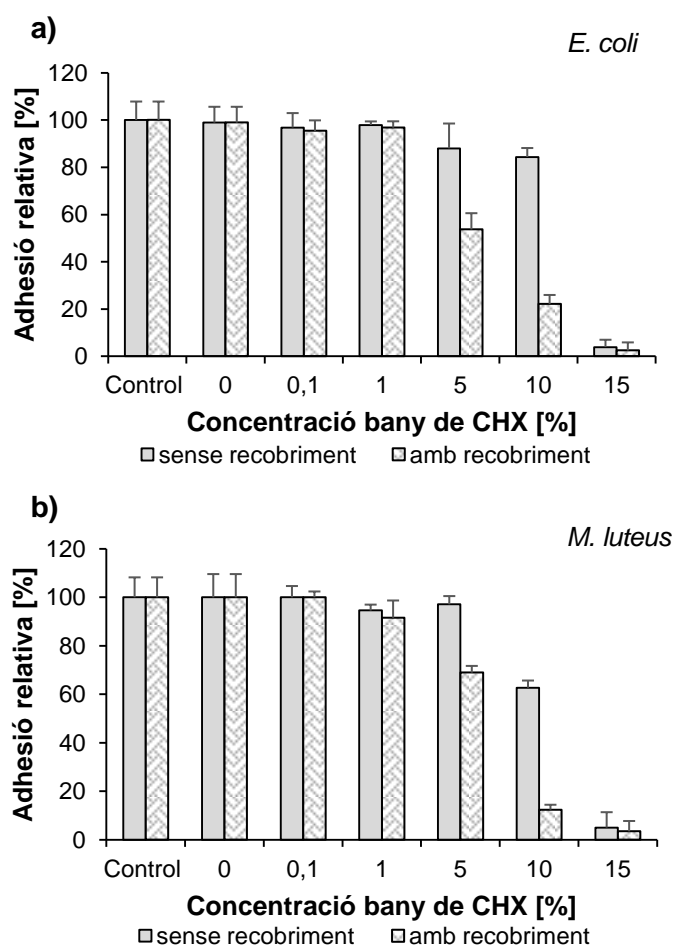


Figura 6.4.7. Adhesió relativa en els fils de sutura carregats amb CHX sense recobrir i recobrint a) dels bacteris *E. coli* i b) dels bacteris *M. luteus*.

6.4.2. Adhesió i proliferació cel·lular en fils de sutura amb CHX i captopril

La clorhexidina és un agent antimicrobià àmpliament utilitzat en varis productes de neteja personal, no obstant, presenta toxicitat i efectes adversos en cèl·lules eucariotes. Per avaluar la biocompatibilitat de les mostres, s'han realitzat assajos d'adhesió (24 h de cultiu) i proliferació (72 h de cultiu) de cèl·lules tipus epitelials (VERO) i fibroblasts (MG-63).

La *Figura 6.4.8.* mostra l'adhesió relativa de les dues línies cel·lulars, en les diferents mostres, respecte el control (mostra sense fàrmac). L'adhesió cel·lular potencia la possible colonització posterior de les cèl·lules en els fils de sutura, factor molt important en el procés de regeneració del teixit suturat.

En conjunt, es pot observar com l'adhesió disminueix al augmentar la concentració de clorhexidina en el bany; únicament en el cas menys concentrat, l'adhesió va ser similar al

control. Les cèl·lules de tipus epitelial, en general, s'adhereixen menys en les mostres recobertes, i les fibroblast presenten una major adhesió en els fils de sutura recoberts. En el cas de les cèl·lules VERO, l'adhesió cel·lular es redueix més d'un 40% en totes les mostres; i en les cèl·lules MG-63 disminueix entre un 20% i un 50%. La pèrdua d'adhesió es pot interpretar com a dany citotòxic, derivat de la concentració de clorhexidina alliberada.

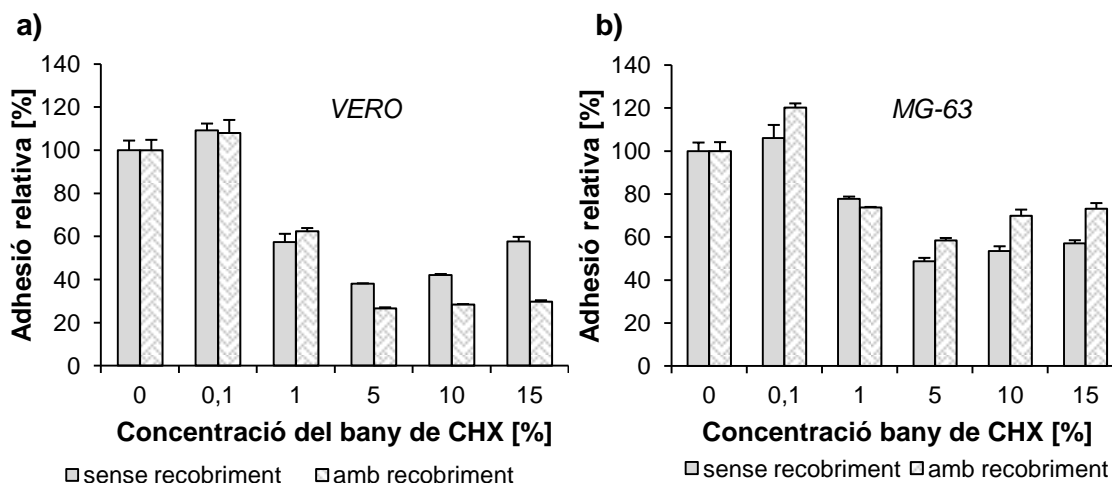


Figura 6.4.8. Adhesió relativa en els fils de sutura, carregats amb CHX sense recobrir i recobrint a) de les cèl·lules VERO i b) de les cèl·lules MG-63.

En les *Figures 6.4.9. i 6.4.10.* es mostren imatges de l'adherència de cèl·lules VERO en els fils de sutura sense compost farmacològic, i amb fils carregats en el bany de clorhexidina al 1% respectivament. Les característiques morfològiques de les cèl·lules es van mantenir normals, i la biocompatibilitat de la superfície dels fils amb clorhexidina es fa evident per la propagació de les cèl·lules i la tendència a formar monocapes cel·lulars.

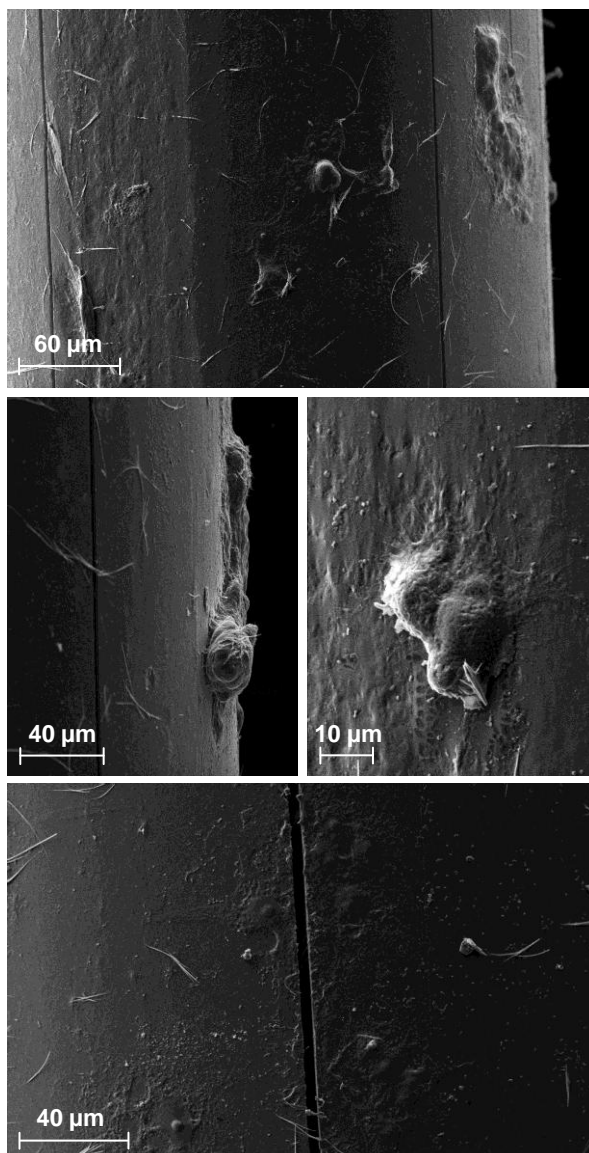


Figura 6.4.9. Imatges obtingudes mitjançant SEM de cèl·lules VERO adherides a fils de sutura sense compost farmacològic.

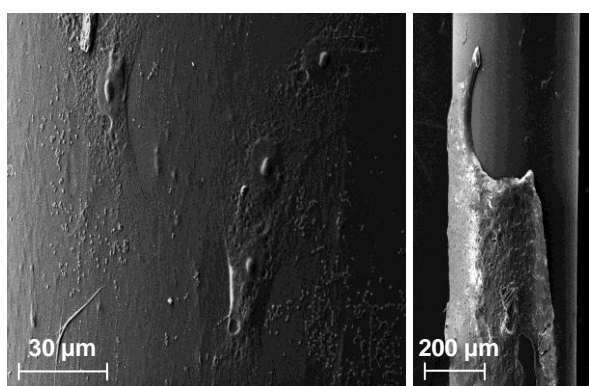


Figura 6.4.10. Imatges obtingudes mitjançant SEM de cèl·lules VERO adherides a fils de sutura carregats en el bany 1% de CHX.

La capacitat de les línies cel·lulars a proliferar en els fils de sutura s'exposa en la *Figura 6.4.11*. Els resultats quantitatius evidencien que, tant per a les cèl·lules VERO com per a les MG-63, concentracions baixes en el bany de clorhexidina, ajuden o mantenen a què proliferin amb normalitat. En general sembla que el copolímer de recobriment proporciona un creixement adequat a les cèl·lules.

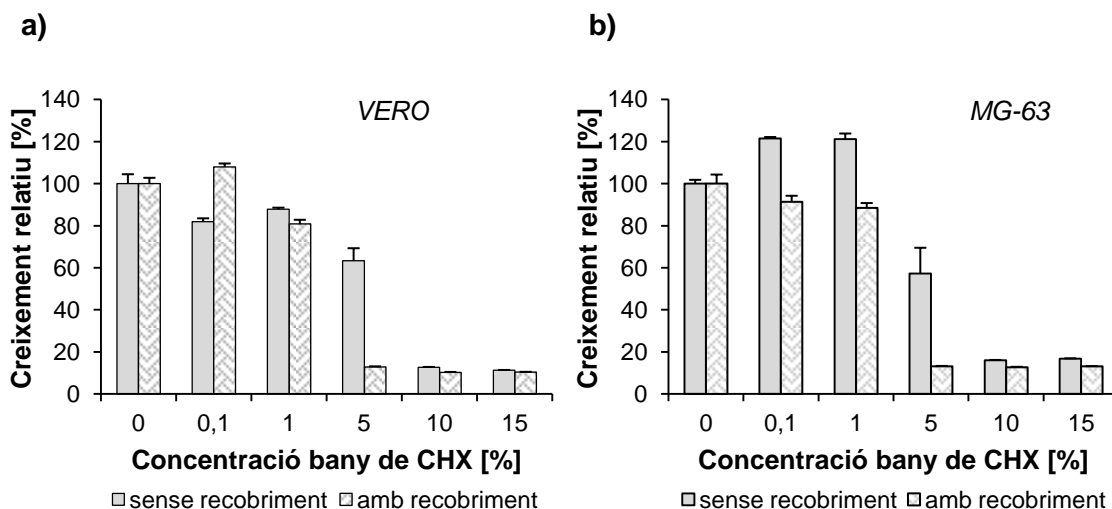


Figura 6.4.11. Proliferació relativa en els fils de sutura, carregats amb CHX sense recobrir i recobrint a) de les cèl·lules VERO i b) de les cèl·lules MG-63.

Els assajos de biocompatibilitat de les mostres treballades amb captopril, van seguir el mateix protocol que les mostres amb clorhexidina. A continuació s'exposen els resultats d'adhesió i proliferació *in-vitro* de les cèl·lules VERO i MG-63 sobre fils carregats amb captopril, sense i amb recobrir.

L'adhesió relativa de les cèl·lules VERO (*Figura 6.4.12. a)*) es manté constant en les mostres sense recobrir i carregades en els tres banys menys concentrats. La presència del copolímer de recobriment, fa que les mostres carregades amb captopril obtinguin una adherència més gran que en el control. Aquest fet pot ser de gran interès alhora de propiciar la proliferació cel·lular, i en conseqüència, augmentar la velocitat de cicatrització de les ferides. Les cèl·lules MG-63 s'adhereixen menys als fils de sutura a mesura que s'augmenta la concentració de captopril en el bany, tant si estan recoberts com no (*Figura 6.4.12. b)*).

Ambdós línies presenten mort cel·lular en mostres carregades en banys del 10% i 15% de captopril sense recobrir.

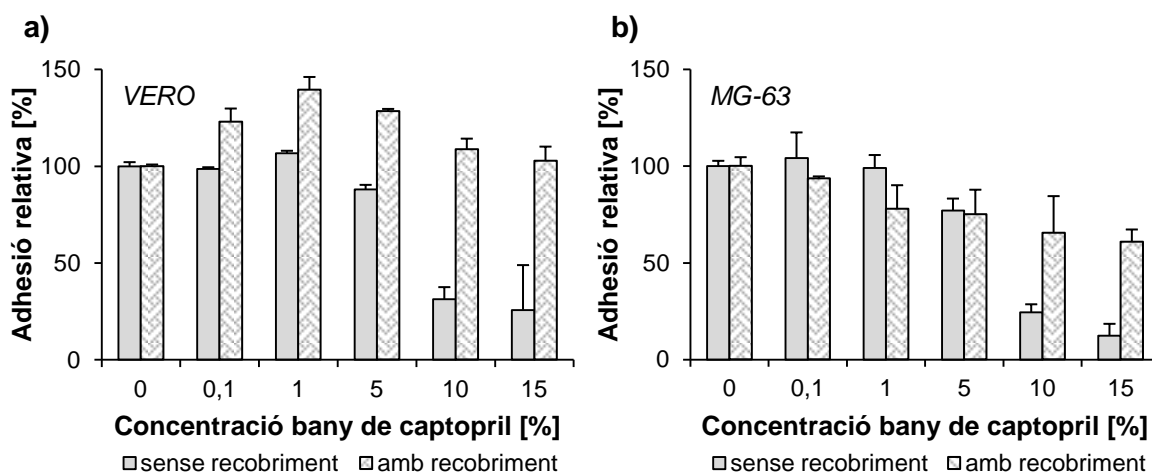


Figura 6.4.12. Adhesió relativa en els fils de sutura, carregats amb captopril sense recobrir i recobrint a) de les cèl·lules VERO i b) de les cèl·lules MG-63.

A la Figura 6.4.13, es pot observar l'adherència de les cèl·lules VERO en fils de sutura carregats en el bany de captopril al 1% i al 15% (sense i amb recobriments). La superfície dels fils amb el fàrmac manifesten biocompatibilitat, existeix una propagació cel·lular i es formen monocapes.

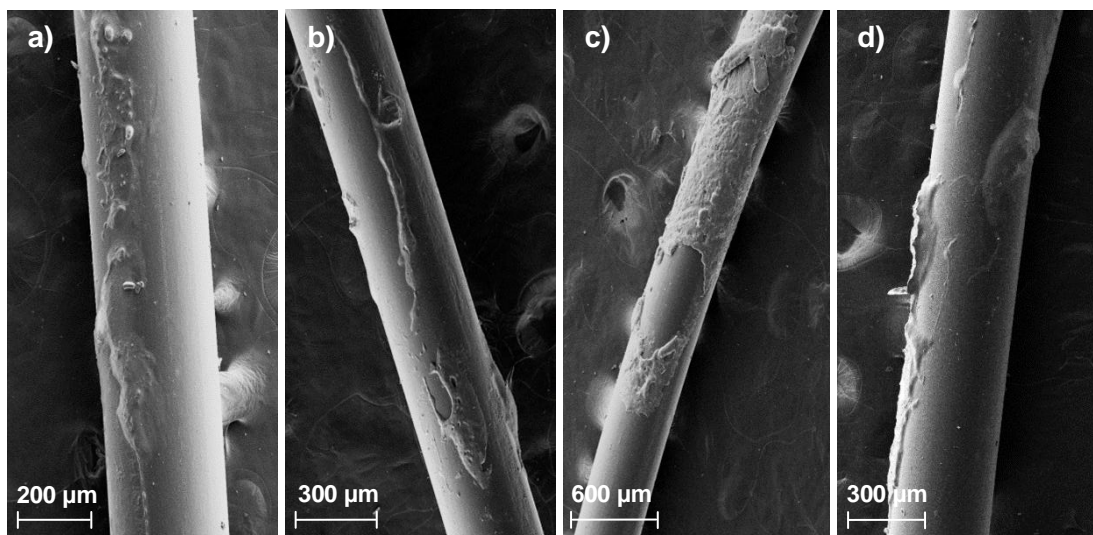


Figura 6.4.13. Imatges obtingudes mitjançant SEM de cèl·lules VERO adherides a fils de sutura carregats en el bany 1% de captopril a) sense recobriments, b) amb recobriments, i en el bany 15% de captopril c) sense recobriments, d) amb recobriments.

Les cèl·lules VERO presenten una proliferació òptima per a les mostres recobertes; únicament disminueix un 8% en el cas de les mostres carregades en el bany de captopril al 15% i posteriorment recobertes. En els fils de sutura carregats en banys del 0,1%, 1% i 5% de fàrmac i sense recobrir, el creixement de la població disminueix poc (entre 2%-20%), mentre que les mostres més concentrades, fan que baixi més del 50% (*Figura 6.4.14. a)*).

En el cas de les cèl·lules MG-63, les mostres recobertes també obtenen major creixement cel·lular, mentre que en les que no ho estan, disminueix entre un 12%-24% per a les dues mostres menys concentrades i entre un 44%-76% per a la resta (*Figura 6.4.14. b)*).

Conseqüentment amb els resultats obtinguts, s'ha de fer notar que els fils de sutura recoberts amb el copolímer sintetitzat són idonis per a aconseguir que la ferida suturada pugui cicatritzar ràpidament.

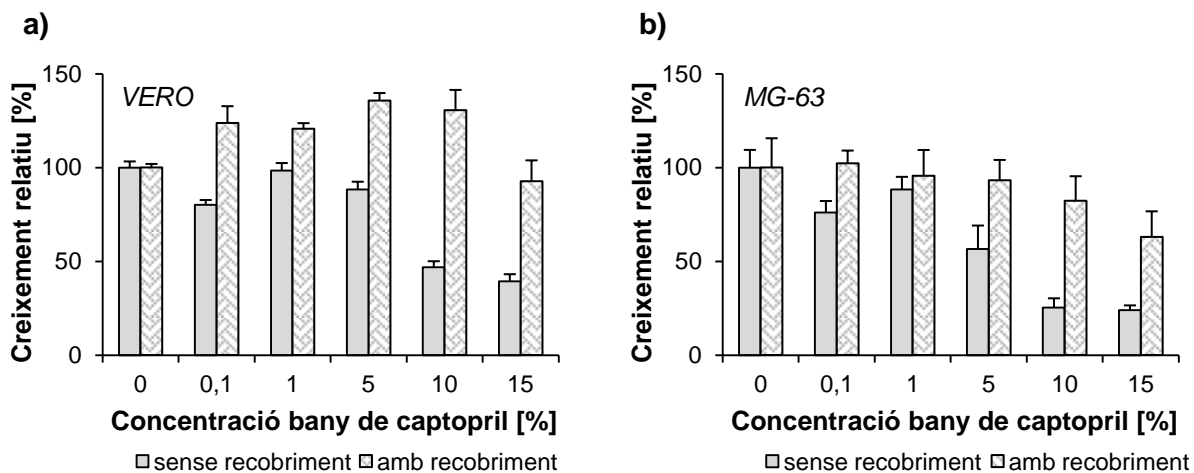


Figura 6.4.14. Proliferació relativa en els fils de sutura, carregats amb captopril sense recobrir i recobrint a) de les cèl·lules VERO i b) de les cèl·lules MG-63.

6.4.3. Activitat cicatritzant dels fils de sutura amb captopril

L'estudi de l'activitat cicatritzant dels fils de sutura carregats en els banys de diferent concentració de captopril, i valorats segons els dos mètodes (sense i amb recobriment), s'ha avaluat mitjançant la realització de microfotografies, observant com la ferida ocasionada s'anava tancant a mesura que passava el temps.

A les *Figures 6.4.15, 6.4.16. i 6.4.17.* s'exposen els resultats obtinguts de les mostres carregades en banys de captopril al 5% i 15%, així com els controls (sutura sense fàrmac), tenint en compte si els fils estan recoberts o no per LA-co-TMC 35:65 3%.

En tots els casos s'observa com la ferida realitzada es va colonitzant de cèl·lules a mesura que passa el temps. No s'aprecia de manera evident cap diferència entre les mostres sense i amb recobriment, com tampoc en les diferents càrregues de fàrmac. Així doncs, sembla que l'estudi efectuat no deixi clar si la incorporació de fàrmac accelera la cicatrització o no. S'hauria de perllongar l'assaig per tal d'extreure alguna deducció. A més, l'assaig requereix d'un anàlisi quantitatiu de la mesura de l'espai de la ferida que es va tancant.

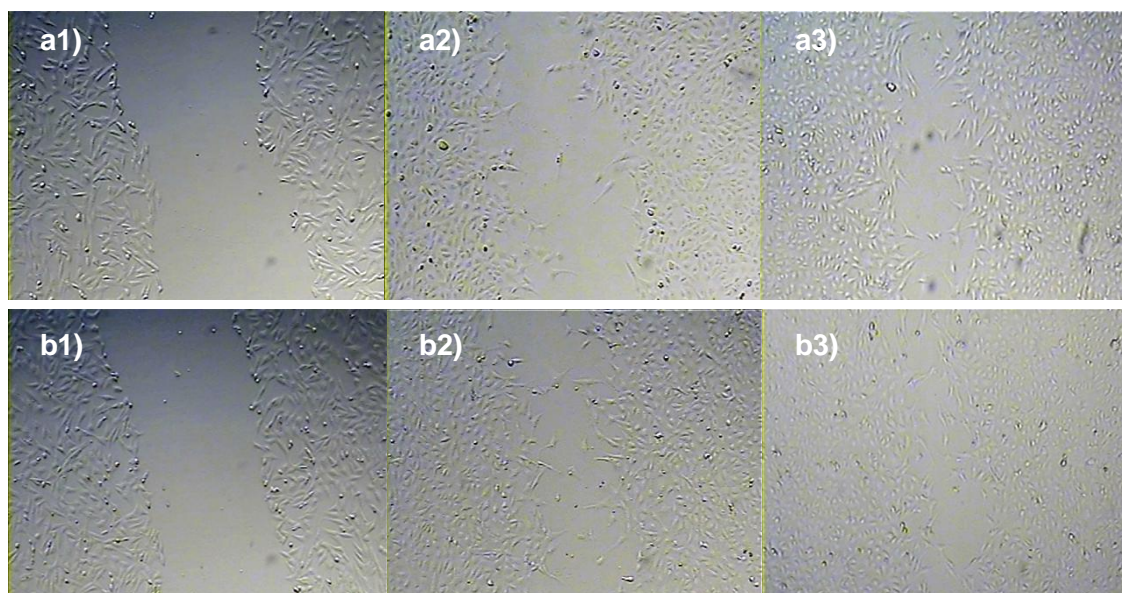


Figura 6.4.15. Efecte cicatritzant dels fils de sutura sense tractar amb captopril a1) sense recobrir (temps 0 h), a2) sense recobrir (temps 21 h), a3) sense recobrir (temps 45h), b1) amb recobriment (temps 0), b2) amb recobriment (temps 21 h) i b3) amb recobriment (temps 45h).

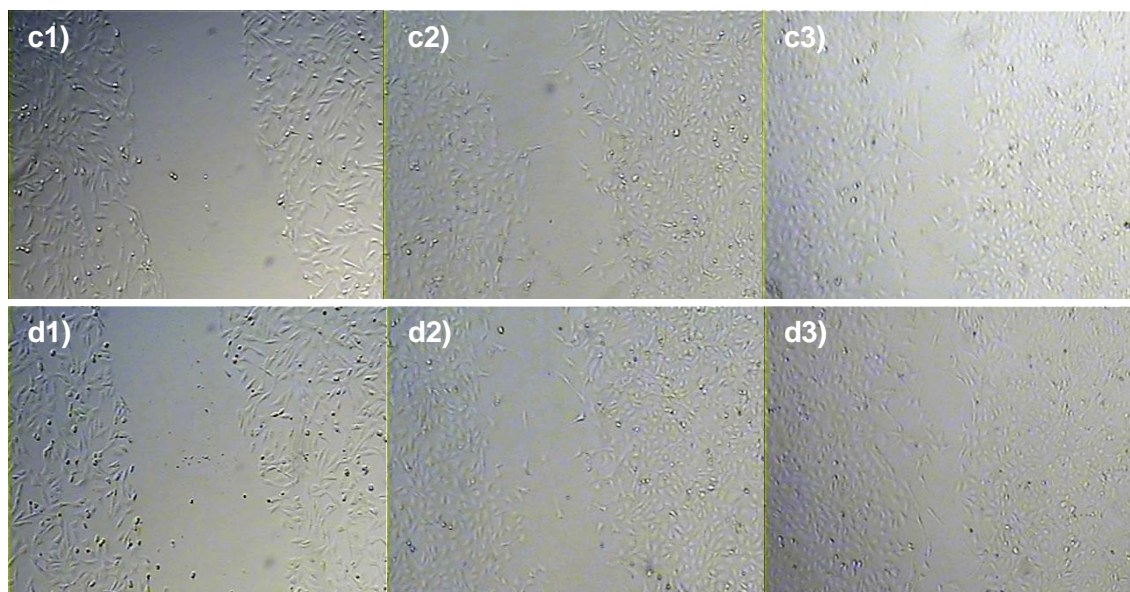


Figura 6.4.16. Efecte cicatritzant dels fils de sutura carregats en un bany al 5% de captopril c1) sense recobrir (temps 0 h), c2) sense recobrir (temps 21 h), c3) sense recobrir (temps 45h), d1) amb recobriment (temps 0), d2) amb recobriment (temps 21 h) i d3) amb recobriment (temps 45h).

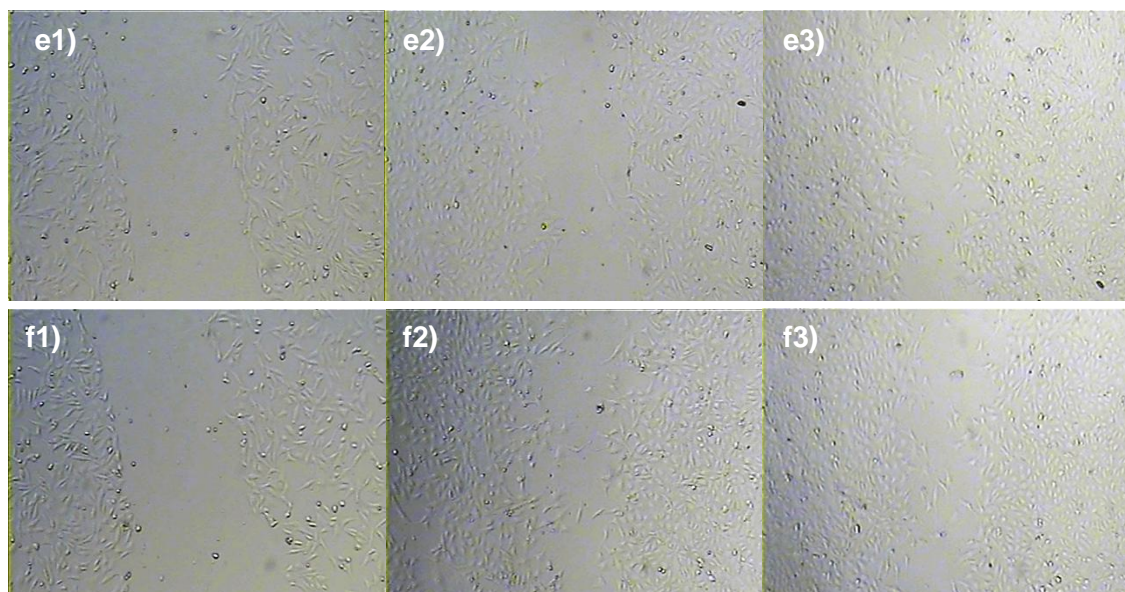


Figura 6.4.17. Efecte cicatritzant dels fils de sutura carregats en un bany al 15% de captopril e1) sense recobrir (temps 0 h), e2) sense recobrir (temps 21 h), e3) sense recobrir (temps 45h), f1) amb recobriment (temps 0), f2) amb recobriment (temps 21 h) i f3) amb recobriment (temps 45h).

Conclusions

En el present projecte s'han desenvolupat fils de sutura monofilars amb activitat antibacteriana o accelerant de cicatrització, valorat la incorporació d'un copolímer de recobriment als fils. S'ha quantificat la càrrega dels fàrmacs i estudiat el comportament d'alliberació d'aquests des dels fils de sutura en medis de diferent hidrofobicitat, així com analitzat l'activitat antibacteriana, la biocompatibilitat i el caràcter cicatritzant. Els resultats obtinguts permeten extreure les següents conclusions:

1. El copolímer sintetitzat presenta un alt pes molecular, i s'ajusta notablement a la proporció en pes que es volia aconseguir. Manifesta una microestructura amorfa amb una $T_g = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. S'ha optimitzat idòniament el procediment de recobrir els fils de sutura, obtenint una pel·lícula fina i homogènia sobre la superfície dels fils.
3. La quantitat incorporada de clorhexidina en els fils de sutura ha sigut pràcticament igual en els mètodes de treball (sense i amb recobriment); el fàrmac no pateix desadsorció al ser introduït en el bany de recobriment. En el cas del captopril, s'ha obtingut una major càrrega en els fils de sutura sense recobrir, manifestant una pèrdua considerable de fàrmac en el bany de recobriment. S'incorpora més quantitat de clorhexidina que de captopril en els fils de sutura, i per ambdós fàrmacs, la quantitat incorporada augmenta al augmentar el percentatge de fàrmac en els bany.
4. Els fils carregats amb clorhexidina presenten una cinètica ràpida d'alliberació, degut a la seva solubilitat en els medis. S'allibera més quantitat de fàrmac en medi EtOH. La presència de recobriment no retarda el procés d'alliberació, i la sutura no pateix canvis importants pel que fa a integritat física.
5. Els fils carregats amb captopril no mostren diferències significatives respecte a l'alliberació. En general, s'allibera més quantitat de fàrmac en les mostres menys carregades, en fils de sutura posteriorment recoberts i en medi EtOH. La sutura tampoc presenta canvis rellevants en la seva superfície.
6. La clorhexidina inhibeix ràpida i eficaçment el creixement bacterià, però només les mostres carregades en banys al 10% i 15% de fàrmac, i posteriorment recoberts, disminueixen l'adhesió bacteriana notablement. Els fils de sutura recoberts tendeixen a ser més eficients dificultant la proliferació i adhesió bacteriana.
7. Les mostres tractades en banys de concentracions baixes de clorhexidina, proporcionen una proliferació cel·lular adequada, i en conjunt, els fils posteriorment

recoberts disminueixen el seu creixement. L'adhesió cel·lular disminueix al augmentar la concentració de clorhexidina en les mostres.

8. Les mostres carregades amb captopril i recobertes, presenten un creixement òptim de les cèl·lules. El copolímer de recobriment ajuda a la proliferació i adhesió cel·lular.
9. La ferida originada en la monocapa cel·lular s'ha anat colonitzant amb el temps. Un anàlisi quantitatiu és necessari per establir el temps en que es tanca la ferida, i determinar així la eficàcia dels fils de sutura carregats amb captopril.

7. Estudi de sostenibilitat

En aquest darrer capítol s'avaluarà la sostenibilitat del desenvolupament del present Projecte Fi de Carrera, tenint en compte els tres pilars de la sostenibilitat: el mediambiental, el social i l'econòmic.

El desenvolupament sostenible es pot definir, segons l'informe *Brundtland*, com^[76]:

“El desenvolupament sostenible és aquell que satisfà les necessitats de la generació actual sense comprometre la capacitat de les generacions futures per satisfer les seves pròpies necessitats”

Els criteris que es seguiran per a la realització de l'estudi seran els següents:

1. Contingut ambiental: s'avalua la relació que presenta el projecte amb el medi ambient i la salut, considerant factors com ara substàncies químiques, recursos, energia, residus i afluents.
2. Contingut social: s'avalua el impacte social que pot tenir el projecte. S'ha de considerar la seguretat i higiene, com a principals elements a valorar.
3. Contingut econòmic: s'avalua el cost global de la realització del projecte.

Considerar també que un projecte ha de ser eficient, repercutint directa i positivament, sobre el consum de recursos i energia; així com la innovació ha de ser un component present en la realització de treballs d'enginyeria.

7.1. Avaluació del impacte ambiental i sobre la salut (EIAS)
















Per avaluar el impacte ambiental, i conseqüentment sobre la salut humana, es seguirà el marc reglamentari de gestió de substàncies químiques, REACH. El sistema REACH, és un sistema integrat de registre, avaluació, autorització i restricció de substàncies químiques. Aquest, pretén millorar la protecció de la salut i del medi ambient mantenint al mateix temps la competitivitat i reforçant la innovació.

El *Reglament (CE) n° 1907/2006* del Parlament Europeu i del Consell, relatiu al sistema REACH, crea l'Agència Europea de Substàncies i Preparats Químics, reformant el marc legislatiu. Aquest reglament és modificat més tard pel *Reglament (CE) n° 1272/2008*, sobre classificació, etiquetatge i envasat de substàncies i mescles, oferint criteris sobre el perill de les substàncies, garantint la protecció de la salut i del medi ambient, identificant propietats fisicoquímiques, toxicològiques i ecotoxicològiques. El *Reglament (UE) n° 286/2011* canvia

el *Reglament (CE) n° 1272/2008*, a efecte d'adaptar-lo al progrés tècnic i científic. No obstant, les substàncies i mescles etiquetades i comercialitzades abans del 1 de desembre del 2012 no estan obligades a adaptar-se al present reglament fins el 1 de desembre del 2014.

D'acord amb el *Reglament (CE) n° 1272/2008*, a les *Taules 7.1.1. i 7.1.2.* es presenten les substàncies perilloses emprades en la realització del projecte, les seves indicacions (*Hazard Statements*) i pictogrames.

Taula 7.1.1. Pictogrames i indicacions de perill de les substàncies químiques emprades.

Substància Química	Pictogrames i Codis
1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol	 H302-H314-H332
Acetat d'etil	 EUH066-H225-H319-H336
Acetona	 EUH066-H225-H319-H336
Blau de trypan	 H350
Captopril	 H317-H361
Clorhexidina	 H302-H318-H410
Cloroform	 H302-H315-H319-H332-H336-H351-H361-H373
DMSO	 H315-H319-H335
Estreptomicina	 H302-H361
Etanol	 H225
Formaldehid	 H301-H311-H314-H317-H331-H335-H351-H370
Lactida	 H315-H319-H335
MTT	 H315-H319-H341
Octanoat d'estany	 H315-H319-H335
Penicil·lina	 H317-H334

Taula 7.1.2. Significat de les indicacions de perill

Codi	Hazard Statements
EUH066	L'exposició repetida pot provocar sequedat o esquerdament de la pell
H225	Líquid i vapor altament inflamable
H301	Tòxic en cas d'ingestió
H302	Nociu per ingestió
H311	Tòxic en contacte amb la pell
H314	Provoca cremades greus a la pell i lesions oculars
H315	Provoca irritació de la pell
H317	Pot provocar una reacció al·lèrgica a la pell
H318	Provoca lesions oculars greus
H319	Provoca irritació ocular greu
H331	Tòxic en cas d'inhalació
H332	Nociu en cas d'inhalació
H334	Pot causar al·lèrgia, símptomes d'asma o dificultat respiratòria si s'inhala
H335	Pot causar irritació respiratòria
H336	Pot provocar somnolència o marejos
H341	Es sospita que provoca defectes genètics
H350	Pot causar càncer
H351	Es sospita que provoca càncer
H361	Es sospita que perjudica la fertilitat o el fetus
H370	Provoca danys en els òrgans
H373	Provoca danys en els òrgans després d'exposicions perllongades o repetides

Les principals matèries primes utilitzades en el treball han estat la lactida, el carbonat de trimetilè, els fils de sutura Monosyn® i els fàrmacs clorhexidina i captopril. Totes aquestes substàncies i materials, ja sigui pel seu caràcter biodegradable com per les quantitats emprades, no representen un perill notable ni per al medi ambient ni per a la salut de les persones. Els altres productes químics utilitzats en el transcurs del desenvolupament del projecte, s'han fet servir en poca quantitat, reduint així els efectes perjudicials que puguin ocasionar.

En la realització del projecte es generen residus líquids provinents dels banys d'incorporació de fàrmacs en els fils de sutura (etanol, i restes de clorhexidina i captopril), dels banys de recobriment (acetat d'etil i LA-co-TMC 35:65) i dels medis d'alliberació (EtOH i fàrmac). Tot i

així, no arriben a ser significants com per a produir un impacte negatiu sobre el medi ambient; es poden recuperar les matèries de partida, així com reutilitzar els banys. També es produeixen residus sòlids; les plaques utilitzades per a la realització dels assajos amb bacteries i cèl·lules, s'han dipositat en un contenidor especial per a residus biològics, tot i que algunes s'han pogut reciclar i reutilitzar.

Els equips i materials diversos de laboratori, porten associats un impacte negatiu indirecte degut a la seva producció, funcionament, transport i rebuig, entre altres. Comentar que aquests factors no es poden controlar dins del que s'emmarca el projecte, i que tots els residus, afluents i consum energètic han estat tractats i usats de forma adequada.

7.2. Avaluació del impacte social

En l'àmbit social, el desenvolupament de sutures amb caràcter antimicrobià aporta beneficis pel que fa a la reducció d'infeccions en la zona suturada, així com una notable disminució de costos associats al tractament de ferides infectades després d'una intervenció. Les quantitats incorporades de fàrmac en els fils de sutura no representarien cap perill, a excepció de les mostres més concentrades. Pel que fa a les sutures amb captopril i posteriorment recobertes, s'ha vist com les cèl·lules colonitzen de manera òptima sobre els fils de sutura, factor a tenir en compte si es vol reduir la cicatriu i propiciar la regeneració de teixit. Tot i així, remarcar que seria necessari la realització d'un estudi *in-vivo* per acabar d'avaluar els efectes d'ambdós fàrmacs.

El preu de la sutura Monosyn® USP 0 varia segons l'agulla que porti. Agafant un valor promig, 70 cm de sutura costaria aproximadament 5,15 euros (1 sobre). Si a aquest fil de sutura se li incorpora clorhexidina dins de les quantitats obtingudes en el projecte (entre 0,8 i 10,13 µg/cm, sense considerar els fils carregats en els banys al 15% de fàrmac), es parlaria d'un augment del preu de cada sobre entre el 0,006% i 0,08%. Aquests valors posen de manifest la disminució de costos postoperatoris de tractament d'infeccions. Econòmicament parlant doncs, la incorporació de clorhexidina en els fils de sutura suposaria un benefici.

Seguint el mateix raonament i tenint en compte tot el rang de quantitat incorporada de captopril (entre 0,3 i 8,06 µg/cm), el preu dels sobres augmentaria entre el 0,019% i 0,51%. Com en el cas de la clorhexidina, l'augment del preu no suposaria un impacte negatiu sobre el sector socioeconòmic.

7.3. Avaluació econòmica

Un projecte no només ha de tenir cura de no produir un impacte negatiu sobre el medi ambient i la societat, sinó que també ha de ser econòmicament viable. Totes les variables han de ser idònies per a que el treball sigui factible.

En aquest apartat s'estima el cost global de la realització del projecte, tenint en compte els costos referents als productes químics utilitzats en la síntesi del copolímer de recobriment, en l'estudi d'incorporació i alliberació dels fàrmacs, així com en l'anàlisi biològic. També s'han de tenir en compte el cost de personal, d'equips i altres despeses generals.

A continuació es mostren els costos associats a la elaboració d'aquest projecte (*Taula 7.3.1.*).

Taula 7.3.1. Costos associats al projecte

Cost Productes químics	Consum	Preu [€/u.]	Total [€]
1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol	101 mL	152/1 Kg	24,50
Acetat d'etil	250 mL	26,18/2,5 L	2,62
Acetona	1,5 L	41,25/5 L	13,38
Captopril	8,708 g	231,50/5 g	403,32
Carbonat de trimetilè	19,50 g	<i>Cedit per B. Braun Surgical</i>	-
Clorhexidina	8,708 g	152,10/25 g	53,00
Cloroform	300 mL	32,00/ 100 mL	96,00
DMSO	1 mL	125,00/1 L	0,13
Estreptomicina	10 g	36,50/ 25 g	14,60
Etanol	3,55 L	15,00/2,5 L	21,30
Formaldehid	24 mL	31,90/25 mL	30,62
Lactida	10,5 g	53,40/25 g	22,43
Monosyn®	5,43 m	<i>Cedit per B. Braun Surgical</i>	-
MTT	120 mg	77,30/1 g	9,23
Octanoat d'estany	0,115 mL	28,80/100 g	0,36
Penicil·lina	80 mL	8,20/ 20 mL	32,80
Subtotal Productes			724,29
Altres (+40% productes químics)			289,72
Total Productes			1.014,00

Cost de personal	Quantitat [h]	Preu [€/h]	Total [€]	
Estudi previ i documentació	128	12,00	1.536,00	
Experimentació	768	15,00	11.520,00	
Anàlisi de resultats	220	20,00	4.400,00	
Total Personal			17.456,00	
Cost d'equips	Preu [€]	Amortització [anys]	nº usuaris	Total [€]
Cabina flux laminar	7.000,00	6	9	97,36
DSC	62.000,00	12	6	647,51
FT-IR+ATR	24.725,00	10	12	154,87
GPC	2.500,00	10	4	46,98
Incubadora CO ₂	5.000,00	5	9	97,36
Lector ELISA	3.440,00	5	10	51,66
RMN	240.000,00	22	9	913,28
SEM	210.000,00	20	10	790,81
UV-Vis	16.500,00	10	10	124,02
Total Equips				2.923,85

El cost dels equips (*Equació 7.3.1.*) s'ha calculat tenint en compte la seva amortització, un interès del 4%, els usuaris i la durada de la part experimental del projecte (9 mesos). El càlcul del cost s'ha fet mitjançant la següent equació:

Equació 7.3.1.

on: P és el preu de l'equip, i la taxa d'interès i n l'amortització.

Finalment, a la *Taula 7.3.2.* es mostra el cost total associat a la realització del projecte. A la suma dels costos de productes químics, de personal i d'equips, se li ha afegit el cost de les despeses generals (material auxiliar, subministrament de llum, aigua,...), i el cost operacional de laboratoris (*Overhead*) de la UPC.

Taula 7.3.2. Cost total del projecte

Concepte	Cost [€]
Cost de productes químics	1.014,00
Cost de personal	17.456,00
Cost d'equips	2.923,85
Cost d'Activitat	21.393,85
Despeses generals (+10% cost d'activitat)	2.139,39
Subtotal PFC	23.533,24
Cost operacional (+21% subtotal PFC, <i>Overhead</i>)	4.941,98
TOTAL	28.475,22

El cost total del present Projecte Fi de Carrera ha estat de 28.475,22 euros.

Agraïments

M'agradaria començar agraïnt als meus directors el Dr. Jordi Puiggali i a la Dra. M^a Lourdes Franco, per la oportunitat d'haver pogut realitzar el meu PFC dins del grup PSEP, pels coneixements i consells transmesos. Gràcies, ha estat molt revelador conèixer un grup universitari d'investigació.

Al Dr. Luís J. Del Valle per tot el que he après amb ell, tota la dedicació aportada i per tenir sempre un moment per fer-li preguntes. També agrair al Dr. Alfonso Rodríguez la realització d'espectres RMN.

Com no, agrair a la futura Dra. Yolanda Márquez, per estar sempre per mi, ajudar-me i compartir bons moments juntes. Així mateix, a totes les persones que he conegut dins del grup, ha estat agradable conviure amb vosaltres; als companys i amics de carrera Heli, Lorena i Marc, als meus amics i familiars els quals els hi avorria summament que parlés de polímers, gràfics i taules.

Per acabar, agrair la col·laboració de l'empresa *B. Braun Surgical S.A.* al desenvolupament d'aquest projecte i pel material facilitat, en especial, al Sr. Pau Turon, Director d'I+D+i, Assumptes Regulatoris i Qualitat.

Bibliografia

- [1] I. Vroman, T. Lan. *Biodegradable Polymers*. Materials 2 (2009) 307-344.
- [2] L. S. Nair, C. T. Laurencin. *Biodegradable polymers as biomaterials*. Progress in Polymer Science 32 (2007) 762-798.
- [3] Suming Li. *Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids*. Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials) 48 (1999) 342-342.
- [4] Donald L. Wise. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. 2000.
- [5] U. Edlund, A.-C. Albertsson. *Polyesters based on diacid monomers*. Advanced Drug Delivery Reviews 55 (2003) 585-609.
- [6] M. G. Rojas Cortés; B. M. Vallejo Díaz; J. E. Perilla. *Biopolymers as materials for developing products in pharmaceutical applications and biomedical uses*. Revista Ingeniería e Investigación 28 (2008) 57-71.
- [7] A.-C. Albertsson, K. M. Stridsberg, M. Ryner, I.K. Varma, U. Edlund, et al. *Degradable Aliphatic Polyesters*. Advances in Polymer Science Volum 157, Springer-Verlag Berlin 2002.
- [8] O. Coulembier, P. Degée, J. L. Hedrick, P. Dubois. *From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly(β -malic acid) derivatives*. Progress in Polymer Science 31 (2006) 723-747.
- [9] M. Zinn, B. Witholt, T. Egli. *Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate*. Advanced Drug Delivery Reviews 53 (2001) 5-21.
- [10] John C. Middleton, Arthur J. Tipton. *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. Biomaterials 21 (2000) 2335-2346.
- [11] Nureddin Ashammakhi, Pentti Rokkanen. *Absorbable polyglycolide devices in trauma and bone surgery*. Biomaterials 18 (1997) 3-9.
- [12] S.M. Davachi, B. Kaffashi, J. Mohammadi Roushandeh, B. Torabinejad. *Investigating thermal degradation, crystallization and surface behavior of L-lactide, glycolide and trimethylene carbonate terpolymers used for medical applications*. 32 (2012) 98-104.

- [13] Joseph D. Bronzino. *Biomedical Engineering Fundamentals*. The Biomedical Engineering Handbook Volum I, Florida 2006 by Taylor & Francis Group, LLC.
- [14] Pathiraja A.Gunatillake, Raju Adhikari. *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*. European Cells and Materials 5 (2003) 1-16.
- [15] Luc Avérous, Eric Pollet. *Environmental Silicate Nano-Biocomposites*. Green Energy and Technology, Springer-Verlag London 2012.
- [16] G.Scott. *Degradable Polymers: Principles and Applications*. Kluwer Academic Publishers 2002.
- [17] A. J. Domb, J. Kost, D. M. Wiseman. *Handbook of Biodegradable Polymers*. OPA, Amsterdam 1997.
- [18] M. Mochizuki, M. Hiram. *Structural Effects on the Biodegradation of Aliphatic Polyesters*. Polymers for Advanced Technologies 8 (1997) 203-209.
- [19] V.R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, A. Trehana. *Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview*. International Journal of Pharmaceutics 278 (2004) 1-23.
- [20] M. J. Mondrinos, R. Dembzyński, L. Lu, V. K. C. Byrapoug, D. M. Wootton, P. I. Lelkes, J. Zhou. *Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone-calcium phosphate scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials 27 (2006) 4399-4408.
- [21] E. Díaz-Celorio, L. Franco, Y. Márquez, A. Rodríguez-Galán, J. Puiggali. *Thermal degradation studies on homopolymers and copolymers based on trimethylene carbonate and glycolide units*. Thermochimica Acta 528 (2012) 23-31.
- [22] S.M. Davachi, B. Kaffashi, J. Mohammadi Roushandeh, B. Torabinejad. *Investigating thermal degradation, crystallization and surface behavior of L-lactide, glycolide and trimethylene carbonate terpolymers used for medical applications*. Materials Science and Engineering C 32 (2012) 98-104.
- [23] Z. Zhang, R. Kuijter, S. K. Bulstra, D. W. Grijpma, J. Feijen. *The in vivo and in vitro degradation behavior of poly(trimethylene carbonate)*. Biomaterials 27 (2006) 1741-1748.
- [24] H. Nishida, M. Yamashita, M. Nagashima, T. Endo, Y. Tokiwa. *Synthesis of Metal-Free Poly(1,4-dioxan-2-one) by Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization*. Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 38 (2000) 1560-1567.

- [25] Xiu-Li Wang, Ke-Ke Yang, Yu-Zhong Wang, Dan-Qi Chen, Si-Chong Chen. *Crystallization and morphology of starch-g-poly(1,4-dioxan-2-one) copolymers*. Polymer 45 (2004) 7961-7968.
- [26] D. F. Williams. *The Williams dictionary of Biomaterials*. Liverpool University Press, 1999.
- [27] D. W. Hutmacher. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials 21 (2000) 2529-2543.
- [28] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, S. Ramakrishna. *Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering*. Material Science and Engineering: C 30 (2010) 1129-1136.
- [29] Mingli Ye, Sungwon Kim, Kinam Park. *Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles*. Journal of Controlled Release 146 (2010) 241-260.
- [30] H. Seyednejad, A. H. Ghassemi, C. F. van Nostrum, T. Vermonden, W. E. Hennink. *Functional aliphatic polyesters for biomedical and pharmaceutical applications*. Journal of Controlled Release 152 (2011) 168-176.
- [31] S. Wang, W. Cui, J. Bei. *Bulk and surface modifications of polylactide*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 381 (2005) 547-556.
- [32] B. P. Chan, K. W. Leong. *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*. European Spine Journal 17 (2008) 467-479.
- [33] D. J. Leaper. *Risk factors for surgical infection*. Journal of Hospital Infection 30 (1995) 127-139.
- [34] Kirtikbhai A. Patel, W. E. G. Thomas. *Sutures, ligatures and staples*. Surgery 26 (2008) 48-53.
- [35] Christopher J. Skilbeck. *Sutures, ligatures and knots*. Surgery 29 (2011) 63-66.
- [36] C. K. S. Pillai, C. P. Sharma. *Absorbable Polymeric Surgical Sutures: chemistry, production, properties, biodegradability and performance*. Journal of Biomaterials Applications 00 (2010) 1-76.
- [37] C. C. Chu. *Polymeric Biomaterials: Textile-Based Biomaterials for Surgical Applications*. Edited by Severian Dumitriu (2002).

- [38] C. E. Edmiston, G. R. Seabrook, M. P. Goheen, C. J. Krepel, C. P. Johnson, B. D. Lewis, K. R. Brown, J. B. Towne. *Bacterial Adherence to Surgical Sutures: Can Antibacterial-Coated Sutures Reduce the Risk of Microbial Contamination?*. Journal of the American College of Surgeons 203 (2006) 481-489.
- [39] B. Braun Surgical [<http://www.bbraun.com/>] [Consultada el 11/03/2013].
- [40] Ethicon [<http://www.ethicon.com/>] [Consultada el 11/03/2013].
- [41] Covidien [www.covidien.com/] [Consultada el 11/03/2013].
- [42] U. S. Pharmacopeia [<http://www.pharmacopeia.cn>] [consultada el 31/05/2013].
- [43] R. S. Bezwada, D. D. Jamiolkowski, I-Y. Lee, V. Agarwal, J. Persivale, S. Trenka-Benthin, M. Ermeta, J. Suryadevara, A. Yang, S. Liu. *Monocryl® suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture*. Biomaterials 16 (1995) 1141-1148.
- [44] B. Braun Surgical. *Suture Glossary*. 1-32.
- [45] G. T. Rodeheaver, J. G. Thacker, J. Owen, M. Strauss, T. Masterson, R. F. Edlich. *Knotting and Handling Characteristics of Coated Synthetic Absorbable Sutures*. Journal of Surgical Research 35 (1983) 525-530.
- [46] SHEA, APIC, CDC, SIS. *Consensus paper on the surveillance of surgical wound infections*. American Journal of Infection Control 20 (1992) 263-270.
- [47] R. F. Edlich, P. H. Panek, G. T. Rodeheaver, V. G. Turnbull. L. D. Kurtz, M. T. Edgerton. *Physical and Chemical Configuration of Sutures in the Development of Surgical Infection*. Annals of Surgery 177 (1973) 679-688.
- [48] S. Katz, M. Izhar, D. Mirelman. *Bacterial Adherence to Surgical Sutures: a possible factor in suture induced infection*. Annals of Surgery 194 (1981) 35-41.
- [49] D. Leaper, A. J. McBain, A. Kramer, O. Assadian, J. L. Alfonso Sanchez, J. Lumio, M. Kiernan. *Healthcare associated infection: novel strategies and antimicrobial implants to prevent surgical site infection*. Annals of The Royal College of Surgeons of England 92 (2010) 453-458.
- [50] C. Mingmalairak. *Antimicrobial Sutures: New Strategy in Surgical Site Infection*. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances 1, Ed. A. Méndez-Vilas (2011) 313-323.

- [51] A. M. Milstone, C. L. Passaretti, T. M. Perl. *Chlorhexidine: Expanding the Armamentarium for Infection Control and Prevention*. Clinical Infectious Diseases 46 (2008) 274-281.
- [52] Arch Chemicals, Inc. *Polyhexamethylene Biguanide (PHMB)*. Product Stewardship Summary (2008).
- [53] C. E. Edmiston, M. Spencer, B. D. Lewis, K. R. Brown, P. J. Rossi, C. R. Henen, H. W. Smith, G. R. Seabrook. *Reducing the Risk of Surgical Site Infections: Did we really think SCIP was going to lead us to the promised land?*. Surgical Infections 12 (2011) 169-177.
- [54] CP Medical [<http://www.cpmedical.com>] [Consultada el 04/06/2013].
- [55] S. Rothenburger, D. Spangler, S. Bhende, D. Burkley. *In vitro antimicrobial evaluation of Coated VICRYL Plus® Antibacterial Suture (coated polyglactin 910 with Triclosan) using zone of inhibition assays*. Surgical Infections 3 Suppl 1 (2002) S79-S87.
- [56] A. Gómez-Alonso, F. J. García-Criado, F. C. Parreño-Machado, J. E. García-Sánchez, E. García-Sánchez, A. Parreño-Machado, Y. Zambrano-Cuadrado. *Study of the efficacy of Coated VICRYL Plus® Antibacterial suture (coated Polyglactin 910 suture with Triclosan) in two animal models of general surgery*. Journal of Infection 54 (2007) 82-88.
- [57] J. Baracs, O. Huszár, S. G. Sajjadi, Ö. P. Horváth. *Surgical Site Infections after Abdominal Closure in Colorectal Surgery Using Triclosan-Coated Absorbable Suture (PDS Plus) vs. Uncoated Sutures (PDS II): A Randomized Multicenter Study*. Surgical Infections 12 (2011) 483-489.
- [58] A. E. Deliaert, E. Van den Kerckhove, S. Tuinder, S. Fieuws, J. H. Sawor, M. A. Meesters-Caberg, R. R. Van der Hulst. *The effect of triclosan-coated sutures in wound healing. A double blind randomised prospective pilot study*. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic surgery 62 (2009) 771-773.
- [59] M. Negroni. *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina (2009) 114.
- [60] KVABpharm [<http://www.kvabpharm.com/en/>] [Consultada el 27/11/2013]
- [61] E. Hidalgo, C. Dominguez. *Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity*. Toxicology in Vitro 15 (2001) 271-276.

- [62] S. Rastegarzadeh, F. Hashemi. *A surface plasmon resonance sensing method for determining captopril based on in situ formation of silver nanoparticles using ascorbic acid*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 122 (2014) 536-541.
- [63] Velázquez, P. Lorenzo, A. Moreno, I. Lizasoain, J.C. Leza, M.A. Moro, A. Portolés. *Farmacología Básica y Clínica*. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, Madrid 18ª edición (2008) 389-395.
- [64] D. Wasserman, A. C. Versfelt. *Use of stannous octoate catalyst in the manufacture of L-lactide-glycolide copolymer sutures*. U.S. Patent 3,839,297 (1974).
- [65] N. Doddi, C. C. Versfelt, D. Wasserman. *Synthetic absorbable surgical devices of poly-dioxanone*. U.S. Patent 4,052,988 (1977).
- [66] R. S. Bezwada, D. D. Jamiolkowski. *Segmented copolymers of epsilon-caprolactone and glycolide*. European Patent 0 441 322 B1 (1991).
- [67] S. Oberhoffner, H. Planck. *Triblockterpolymer, seine Verwendung für chirurgisches Nahtmaterial und Verfahren zur Herstellung*. D. E. Patent 19641335 A1 (1998).
- [68] T. A. Barbolt. *Chemistry and safety of triclosan, and its use as an antimicrobial coating on Coated Vicryl Plus Antibacterial Suture (coated polyglaction 910 suture with triclosan)*. Surgical Infection 3 Suppl 1 (2002) S45-S53.
- [69] R. Zurita, J. Puiggalí, A. Rodríguez-Galán. *Triclosan Release from Coated Polyglycolide Threads*. Macromolecular Bioscience 6 (2006) 58-69.
- [70] R. Zurita, J. Puiggalí, A. Rodríguez-Galán. *Loading and Release of Ibuprofen in Multi- and Monofilament Surgical Sutures*. Macromolecular Bioscience 6 (2006) 767-775.
- [71] J. I. Goldstein, C. E. Lyman, D. E. Newbury, E. Lifshin, P. Echlin, L. Sawyer, D. C. Joy, J. R. Michael. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Third edition (2003) 21-25.
- [72] E. Hidalgo, C. Dominguez. *Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity*. Toxicology in Vitro 15 (2001) 271-276.
- [73] P. Bhowmik, K. Koutsu. *Design fabrication and in vitro evaluation of novel donut shaped tablet*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6 (2014) 617-621.

- [74] K. Florey, H. Kadin. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press, Inc. New York, Vol. 11 (1982) 107-111.
- [75] Z. Moldovan. *A spectrophotometric method for captopril determination by using fluorescein sodium-bromine system*. Revue Roumaine de Chimie 57 (2012) 721-727.
- [76] General Assembly United Nations. *Report of the world commission on environment and development*. (1987)